

Aus der klinischen Kooperationseinheit Dermatoonkologie des Deutschen
Krebsforschungszentrums (DKFZ) an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Leiter: Prof. Dr. med. Jochen Utikal)

Immunhistochemische Untersuchung prognostischer Marker
beim malignen Melanom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Katharina Christa Jäger
aus
Heidelberg
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Prof. Dr. med. Jochen S. Utikal

Erkenntnisse dieser Dissertation wurden publiziert in

Jäger, Katharina, Lionel Larribere, Huizi Wu, Christel Weiss, Christoffer Gebhardt, and Jochen Utikal

“Expression of Neural Crest Markers GLDC and ERRF11 Is Correlated with Melanoma Prognosis.“

Cancers (Basel), 2019 Jan 11

Inhalt

1. Grundlagen: Malignes Melanom	1
1.1 Entwicklung von Melanozyten	1
1.2 Epidemiologie des malignen Melanoms	2
1.3 Risikofaktoren.....	3
1.4 Subtypen des malignen Melanoms	4
1.5 Stadieneinteilung und Prognose.....	5
1.6 Prognostische Marker	6
1.7 Histomorphologische Marker.....	7
1.8 Immunhistochemische Marker.....	8
1.9 Serologische Marker	9
2. Therapie und Nachsorge.....	11
2.1 Checkpoint-Inhibitoren	12
2.2 Zielgerichtete Therapie („targeted therapy“)	13
2.3 Talimogen laherparepvec (T-VEC).....	15
2.4 Zytotoxische Chemotherapie.....	15
3. Praktische Grundlagen und Ziele des Projekts	16
4. Material und Methoden	19
4.1 Patientenkollektiv	19
4.2 Verarbeitung der Tumorproben	24
4.3 TMA-Anfertigung	24
4.4 Verarbeitung der TMAs	25
4.5 Digitalisierung der Daten und Auswertung	27
5. Ergebnisse	30
5.1. Vergleich Kurzzeitüberleber- versus Langzeitüberleber-Gruppe	30
5.2. Vergleich Hochrisikogruppe A versus Hochrisikogruppe B	39

6. Diskussion.....	46
6.1 NGFR-Gen (CD271).....	46
6.2 GLDC-Gene	47
6.3 ERFFI1-Gen.....	47
6.4 TWIST-Gen	48
6.5 MSX1-Gen.....	50
6.6 MKI67-Gen	50
6.7 PTPRF-Gen.....	51
6.8 TNFRSF12A-Gen.....	52
6.9 TNFRSF21-Gen	53
6.10 IGFBP2-Gen.....	53
6.11 Klinische und laborchemische Parameter	54
7. Zusammenfassung.....	57
8. Literaturverzeichnis	59
9. Anhang.....	82
10. Lebenslauf	90
11. Danksagung.....	92

1. Grundlagen: Malignes Melanom

1.1 Entwicklung von Melanozyten

Melanozyten sind die pigmentbildenden Zellen der Haut. Sie sind in der epidermalen Basalschicht lokalisiert, wo sie 5-10% der Zellen ausmachen. Ihre Aufgabe ist es, durch Pigmentbildung eine Barriere gegen UV-Strahlen aufzubauen. Diese Funktion wird erfüllt, indem in spezifischen Zellorganellen, den Melanosomen, Melanin synthetisiert wird, das an benachbarte Keratinozyten abgegeben wird. Bei den Melanozyten handelt es sich um Abkömmlinge der Neuralleiste. Während der Embryonalentwicklung entstehen drei Keimblätter: das Ektoderm, das Endoderm und das Mesoderm. Jedes Blatt ist für die Bildung bestimmter Strukturen und Organe zuständig. Während eines als Neurulation bezeichneten Vorganges kommt es zu einer Einstülpung des dorsalen Ektoderms, wobei das Neuralrohr als Vorläufer des zentralen Nervensystems entsteht. Die Übergangszone zwischen dem zukünftigen Neuralrohr und dem Ektoderm löst sich als Neuralleiste ab. Der Verlust der Zellpolarität ist dabei eine wichtige Voraussetzung, damit Zellen migrieren können. Die Neuralleistenzellen migrieren durch den Körper, um letztendlich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Knecht et al. 2002; Silver et al. 2006). Bevor sie differenzieren, unterliegen Neuralleistenzellen einer Spezifizierung durch verschiedene Regulatoren (z.B. Wingless/INT-related (Wnt) 1 und 3) und die Transkriptionsfaktoren PAX3 (Paired box transcription factor) und FOXD3 (Forkhead Box D3). Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen multipotent und exprimieren unter anderem folgende Neuralleistenmarker: SOX10, SOX9 und in Mäusen SNAIL2. Unter dem Einfluss von Transkriptionsfaktoren wie SOX10, PAX3, FOXD3 und MITF, differenzieren sich Neuralleistenzellen zu Melanoblasten. MITF ist einer der wichtigsten Regulatoren für die Entstehung von Melanozyten (Baxter et al. 2010). Die Expression dieses Transkriptionsfaktors wird durch PAX3 und SOX10 initiiert. Damit sich die gemeinsame Vorläuferzelle von Schwannzellen und Melanozyten in Richtung Melanozyten differenziert, bedarf es zweier weiterer Regulatoren: FOXD3 und SOX2 (Mort et al. 2015). Melanoblasten, Vorläuferzellen der Melanozyten, wandern in die Dermis und schließlich in die Epidermis, wo sie zu Melanozyten ausdifferenzieren, die kontinuierlich proliferieren und aktiv migrieren. In den Haarfollikeln verbleiben melanozytäre Stammzellen, die für die Regeneration der Melanozyten während des

Haarzykluses verantwortlich sind. Zudem sind sie an der Regeneration nach Hautverletzungen beteiligt (Chang et al. 2014). Diese unterschiedlichen Differenzierungsstadien sind gekennzeichnet durch spezifische Genexpressionsmuster, die den Zellen definierte Charakteristika verleihen (Cichorek et al. 2013).

1.2 Epidemiologie des malignen Melanoms

Beim malignen Melanom handelt es sich um einen bösartigen Tumor des melanozytären Zellsystems, der vorwiegend im mittleren Lebensalter (50-60 Lebensjahr) auftritt. Durch die frühzeitige Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung hat es eine ungünstige Prognose (Moll et al. 2016).

Das maligne Melanom gehört in Deutschland mit 10.470 Neuerkrankungen bei Frauen und 10.940 Neuerkrankungen bei Männern zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen, sowohl bei Männern, als auch bei Frauen (Robert Koch-Institut 2016). Die Erkrankungsraten sind seit 1980 bei Frauen altersstandardisiert um 270%, bei Männern um 210% angestiegen (Bertz et al. 2010). Nach der Einführung des Hautkrebs-Screenings 2008 als Leistung der gesetzlichen Krankenversicherung kam es zu einem Anstieg der Diagnoserate. Bei Frauen stieg die Inzidenz von 2007 auf 2008 um 14%, bei Männern um 21% (Robert Koch-Institut 2016). Eine vergleichbare Steigung der Inzidenzrate zeigt kein anderer solider Tumor. Bisher ist kein Rückgang der Inzidenzraten erkennbar (Robert-Koch-Institut 2012).

Unter den Inzidenzraten lässt sich ein geographischer Nord-Süd-Gradient erkennen. Während in Deutschland die Inzidenzrate 2008 bei 21,2-22,1 Fällen/100.000 Einwohnern lag, traten die höchsten Inzidenzraten weltweit in Australien und Neuseeland mit 50-60 Fällen/100.000 Einwohnern auf. Dies hängt zum einen mit dem erhöhten Melanomrisiko durch Sonnenexposition besonders in der Kindheit und Jugend zusammen und zum anderen mit dem Hauttypus. Die Inzidenz des malignen Melanoms ist bei hellhäutigen, UV-empfindlichen Personen (Hauttyp I und II) deutlich erhöht gegenüber dunkelhäutigen Personen (Hauttyp III und IV). Bei Menschen mit stärkerer Pigmentierung (Afrikaner, Asiaten) hingegen ist das Melanom selten und kommt nahezu ausschließlich palmoplantar vor. Der generelle Anstieg der Inzidenzraten ist darüber hinaus durch Änderungen der Freizeitgewohnheiten, die mit

vermehrter Sonnenexposition einhergehen, erklärbar (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016; Robert Koch-Institut 2016).

Unter allen Hauttumoren hat das maligne Melanom die höchste Metastasierungsrate und ist für 90% aller Hautkrebs-bedingten Sterbefälle verantwortlich (Robert Koch-Institut 2016; Deutsche Krebsgesellschaft et al. 2016, Robert-Koch-Institut 2016). 2013 starben 1.255 Frauen und 1.787 Männer an einem malignen Melanom (Robert Koch-Institut 2016). Die Mortalitätsrate stieg für beide Geschlechter von 1999 bis 2008 um 23%. Vergleicht man den Anstieg der Inzidenzraten mit denen der Mortalitätsraten, ist zu erkennen, dass dieser deutlich geringer ausfällt, was auf eine relative Stabilisierung der Mortalitätsraten schließen lässt (Breitbart et al. 2012). Eine Rolle hierbei könnte spielen, dass die meisten Melanome in frühen, prognostisch günstigeren Stadien (I-IIb) diagnostiziert werden (Balch et al. 2009). Daraus lässt sich außerdem ableiten, dass die Prävalenzrate weit über der Inzidenzrate liegen muss. Diese betrug 2013 in Deutschland rund 95.000 Neuerkrankungen (Robert Koch-Institut 2016).

1.3 Risikofaktoren

Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führen zur Entstehung eines malignen Melanoms. Diese Mutationen sind überwiegend durch UV-Strahlen induziert. Zu den häufigsten Mutationen zählen BRAF- und NRAS-Genmutationen, welche eine Wachstumsinduktion von zur Folge haben. PTEN- und p53-Mutationen betreffen dagegen Tumorsuppressorgene (Pal et al. 2016). Für die Entstehung von Mutationen ist die Interaktion von genetischen und durch die Umwelt bedingten Faktoren von Bedeutung. Hellhäutige, UV-empfindliche Personen, die nahe am Äquator wohnen, haben somit ein erhöhtes Risiko an einem Melanom zu erkranken. Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms ist das Auftreten von multiplen Vorläuferläsionen (≥ 100 gewöhnliche melanozytäre Nävi oder ≥ 5 atypische melanozytäre Nävi und ≥ 50 gewöhnliche melanozytäre Nävi) (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016; Moll et al., 2016). Bei 5-10% der Patienten ist eine familiäre Häufung zu beobachten. Als besonders gefährdet gelten Patienten, die ≥ 5 atypische melanozytäre Nävi aufweisen und aus einer Familie mit gehäuft auftretendem malignem Melanom stammen. Des Weiteren zählt zu den Risikofaktoren das Auftreten eines Melanoms in der eigenen Vorgeschichte sowie Immunsuppression (Garbe et al. 1994; Grob et al. 1990; Holly et al. 1987).

1.4 Subtypen des malignen Melanoms

Histopathologisch lässt sich das maligne Melanom in vier Subtypen unterteilen. Das superfiziell-spreitende Melanom (SSM) ist mit ca. 55% der häufigste Melanomtyp. Klinisch imponiert das SSM als asymmetrische, makulöse Pigmentläsion, die scharf, aber unregelmäßig begrenzt ist. Teilweise zeigen sich exzentrisch papulöse Anteile. Charakteristisch ist das Auftreten verschiedener Farbtöne. Primär besteht eine horizontale Wachstumstendenz. Das SSM kann in ein noduläres Melanom übergehen.

Das noduläre Melanom (NMM) tritt in etwa 20% der Fälle auf. Es handelt sich um einen knotigen, exophytisch-wachsenden Tumor, der überwiegend schwarz-braun imponiert und häufig erosiv blutet. Das Tumorstadium erfolgt primär vertikal, was mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Bei ca. 10% der Subtypen handelt es sich um ein Lentigo-maligna-Melanom (LMM), das fast ausschließlich an sonnenexponierten Hautarealen (insbesondere Gesicht) bei älteren Patienten vorkommt. Die makulöse Pigmentläsion ist meist unscharf begrenzt, weist verschiedene Brauntöne mit teilweise schwarzen Anteilen auf und geht in der Regel aus einem Melanoma in situ (Lentigo maligna) hervor.

Das akrolentiginöse Melanom (ALM) zählt zu den seltenen Melanomformen und tritt vorwiegend palmoplantar und subungual auf. Zunächst imponiert es meist als unscharf begrenzte, inhomogene Pigmentierung, die in ulzerierende Knoten übergehen kann. Unter dem Nagel befindliche Tumore zeigen sich häufig als bräunliche Flecken oder streifige Pigmentierung des Nagelbetts, die auch auf die Nagelumgebung übergreifen können.

Zu weiteren Sonderformen des Melanoms zählen das amelanotische maligne Melanom, das Aderhautmelanom und das Schleimhautmelanom sowie unklassifizierbare maligne Melanome (Moll et al. 2016).

1.5 Stadieneinteilung und Prognose

Die Tumorklassifikation ist eine entscheidende Grundlage für die Einordnung der Tumoren hinsichtlich Prognose und diagnostischem sowie therapeutischem Vorgehen. Das maligne Melanom wird nach der TNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) aus dem Jahr 2017 klassifiziert. Diese setzt sich aus der Klassifikation des Primärtumors (T-Klassifikation), der Klassifikation regionärer Lymphknoten (N-Klassifikation) und der Klassifikation der Fernmetastasen (M-Klassifikation) zusammen. Das Hauptaugenmerk bei der T-Klassifikation liegt auf der Tumordicke nach Breslow und der Tumorulzeration. Die Mitoserate (definiert als Mitosen/mm²) sowie die Invasionstiefe (CLARK-Level) finden aktuell keine Anwendung mehr (Gershenwald et al. 2017a).

Die N-Klassifikation berücksichtigt die Ausbreitung des Tumors auf regionale Lymphknoten und die Anzahl befallener Lymphknoten. Des Weiteren wird unterschieden, ob sich der Tumorbefall rein mikroskopisch oder auch klinisch darstellt („clinically occult“ vs. „clinically detected“). Die Klassifikation berücksichtigt darüber hinaus das Vorhandensein von Satelliten- oder Intransitmetastasen.

Fernmetastasen treten auf, wenn sich Tumorzellen jenseits der regionären Lymphknoten oder Lymphbahnen ansiedeln. Die M-Klassifikation differenziert zwischen nicht-viszerale Metastasen (M1a), Lungenmetastasen (M1b), Fernmetastasen anderer, viszeraler Lokalisation (M1c) sowie Fernmetastasen des zentralen Nervensystems (M1d), wobei zusätzlich weitere Parameter (erhöhte Serumwerte der Laktatdehydrogenase) eingeschlossen werden (Balch et al. 2009), (*Anhang-Tabelle A*).

Die Einteilung des malignen Melanoms erfolgt unter Berücksichtigung der drei oben beschriebenen Klassifikationen in 4 Stadien.

Stadium I umfasst Patienten mit ulzerierten Tumoren bis Tumordicken < 0.8 mm sowie nicht-ulzerierte Primären bis ≤ 2 mm. Nicht-ulzerierte sowie ulzerierte Tumoren mit Tumordicken von > 2 mm ohne Metastasierung werden im Stadium II zusammengefasst. Stadium III liegt vor, sobald regionale Metastasen oder Metastasen im regionalen Lymphabflussgebiet auftreten. Stadium IV schließt alle Patienten mit Fernmetastasen ein (Gress 2017; Gershenwald et al. 2017), (*Anhang-Tabelle B*).

Mit höherer Einstufung in die jeweiligen Stadien verschlechtert sich die Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate und die 10-Jahres-Überlebensrate basierend auf der TNM-Klassifikation variieren von 97% und 93% bei Patienten mit T1aN0M0 (Stadium IA), bis hin zu 53% und 39% bei Patienten, die als T4bN0M0 (Stadium IIC) eingestuft wurden. Ulzerierte Primärmelanome zeigen eine proportional niedrigere Überlebensrate im Vergleich zu nicht-ulzerierten Melanomen in der entsprechenden T-Klassifikation, haben allerdings eine vergleichbare Überlebensrate, wie nicht-ulzerierte Primärtumoren der nächst höheren T-Klassifikation.

Die 5-Jahres-Überlebensraten im Stadium III betragen 78%, 59% und 40% für Stadium IIIA, IIIB und IIC. Bei Patienten mit Fernmetastasen beträgt die 1-Jahr-Überlebensrate für M1a, M1b und M1c 62%, 53% und 33%. Im Stadium IV hat sich ein erhöhter Lactat-Dehydrogenase-Spiegel im Serum als signifikanter, unabhängiger Marker für die Überlebensrate etabliert. Die 1-Jahr-Überlebensrate betrug bei Patienten mit normalen LDH-Spiegeln 65%, wohingegen bei Patienten mit erhöhten LDH-Spiegeln die 1-Jahr-Überlebensrate lediglich bei 32% lag (Balch et al. 2009).

Für die vorliegende Arbeit wurde die Tumorklassifikation anhand der Kriterien der TMN-Klassifikation der AJCC aus dem Jahre 2009 verwendet.

1.6 Prognostische Marker

Biologische und serologische Marker sollen dazu beitragen, Erkrankungen früher zu erkennen, Diagnosen zu sichern, Prognosen abzuschätzen und eine Vorhersage über ein mögliches Ansprechen auf eine Therapie zu ermöglichen. Tumormarker, die in Tumorgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe stärker exprimiert sind, dienen als diagnostische Marker. Marker, die in fortgeschrittenen Stadien vermehrt exprimiert werden, dienen hingegen als prognostische Marker. Andere Marker wiederum sollen der Kontrolle von Therapieverläufen dienen (Vereecken et al. 2012).

Neben interventionell bestimmten Markern spielt die anatomische Lokalisation der Primären hinsichtlich der Prognose eine Rolle. Melanome, die sich am Rumpf, Kopf und Nacken befinden, gehen mit einer schlechteren Prognose einher, als Primären, die an den Extremitäten auftreten, da sie häufiger in die Ferne metastasieren. Melanome der Extremitäten hingegen metastasieren häufiger lokal (Leiter et al. 2004). Eine Hochrisikogruppe stellen Patienten über 60 Jahren da. Neben der Tatsache, dass

ältere Patienten häufiger dicke, ulzerierte Melanome aufweisen, geht man davon aus, dass die Abwehrmechanismen älterer Menschen geschwächt sind und somit die Tumor-Morbidität und Mortalität steigt. Bezüglich des Geschlechtes gibt es große Unterschiede zwischen den verschiedenen Kontinenten. Während die Inzidenzraten in den USA und Australien bei Männern höher liegen, ist in Europa die der Frauen höher. Davon abgesehen ist die Überlebensrate der Frauen weltweit höher, als die der Männer (Mervic 2012).

1.7 Histomorphologische Marker

Wie bereits oben beschrieben, werden zur Risikostratifizierung und Prognoseabschätzung verschiedene prognostische Marker eingesetzt. Neben der vertikalen Tumordicke, die als wichtigster prognostischer Faktor in den Primärstadien gilt und der Ulzeration des Primärtumors, hat sich die Mitoserate als aussagekräftiger Prognosemarker für das Gesamtüberleben herausgestellt (Balch et al. 2009; Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016). 1970 hat Alexander Breslow die Tumorprognose von malignen Melanomen in Zusammenhang mit der vertikalen Tumordicke gebracht (Breslow 1970). Diese bezeichnet den Abstand zwischen der oberen Grenze des epidermalen Stratum granulosum und der tiefst gelegenen Melanomzelle in der Dermis oder Subkutis (Breslow 1970; Scolyer et al. 2013). Mit zunehmender Tumordicke sinkt die Gesamtüberlebensrate (Balch et al. 2009). Nach der Tumordicke nach Breslow gilt die Mitoserate als aussagekräftigster, unabhängiger Marker für Melanom-spezifisches Überleben (Thompson et al. 2011). Die Bestimmung der Mitoserate wird bei Tumoren mit einer Tumordicke von ≥ 1.0 mm durchgeführt. Mit zunehmender Mitoserate nimmt die Überlebenszeit ab (Balch et al. 2009). Primarien im ulzerierten Stadium gehen mit einer verringerten Progressions-freien Zeit und einem verringertem Gesamtüberleben einher. Ulzerationen sind definiert als das Fehlen einer intakten Epithelschicht (Callender and McMasters 2011). Ein weiteres histologisch ungünstiges Kriterium ist der Einbruch des Tumors in Venen- oder Lymphgefäße (Kashani-Sabet et al. 2001). Ausgedehnte Tumordicke, positiver Ulzerationsstatus und eine erhöhte Mitoserate sind zusätzlich Risikofaktoren für das Vorliegen eines positiven Wächterlymphknotens. Für mittlere Tumordicken dient der Sentinellymphknoten als prognostischer Marker (Munsch et al. 2014), bei dünnen ergänzt er die Aussagekraft der Tumordicke nach Breslow allerdings nicht (Freeman et al. 2013).

1.8 Immunhistochemische Marker

Human Melanoma Black-45 (HMB-45), Melan-A, Tyrosinase, Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor (MITF) und S100 sind die bekanntesten immunhistochemischen Marker, die zur Diagnosestellung beim malignen Melanom in Betracht gezogen werden können (Weinstein et al. 2014).

HMB-45 ist ein monoklonaler Antikörper der Maus, der sich gegen Melanomzellen, aber auch gegen benigne Läsionen richtet (zum Beispiel Junktionsnävi) (Dean et al. 2002), wohingegen normale, adulte Melanozyten nicht angefärbt werden (Gown et al. 1986; Ordonez 2014). Die Sensitivität beträgt 69-93%, die Spezifität 56-100% (Jing, Michael, and Theoharis 2013).

Melan-A ist ein Antigen, das in Melanozyten, Melanomzellen und dem pigmentierten Retinaepithel exprimiert wird. Es zeigt eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 98% bei der Differenzierung zwischen melanotischen und nicht-melanotischen Neoplasien sowie eine Sensitivität von 75-92% bzw. eine Spezifität von 95-100% in der Erkennung von Melanomzellen (Weinstein et al. 2014; Jing, Michael, and Theoharis 2013). Insgesamt wird es in etwa 85-97% der Primärmelanome und 57-92% der metastasierten Melanome exprimiert (Ordonez 2014).

Tyrosinase ist ein Enzym, das in die Biosynthese von Melanin involviert ist und somit sowohl in Melanozyten, als auch in Melanomzellen exprimiert wird. Es kann als immunhistochemischer Marker mit einer Sensitivität von 90-100% für Primarien und mit abnehmender Sensitivität in fortgeschrittenen Stadien eingesetzt werden. Die Spezifität zur Differenzierung von melanotischen zu nicht-melanotischen Tumoren beträgt 97-100% (Weinstein et al. 2014). Der Marker wird von ca. 80-90% der Melanome exprimiert (Ordonez 2014).

MITF ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Melanozytendifferenzierung während der Embryonalentwicklung beteiligt ist. Der Transkriptionsfaktor hat sich als nützlicher Marker bei metastasierten Melanomen erwiesen (Miettinen et al. 2001). Allerdings hat er sich als nur wenig spezifischer Marker herausgestellt, da er neben Melanomzellen auch Histiozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Schwannzellen und glatte Muskelzellen anfärbt. Die Sensitivität der Diagnostik von Primarien beträgt etwa 87-100% (Weinstein et al. 2014).

S100 ist eine Familie von über 24 Proteinen, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt ist. S100 war der erste Marker, der sich als nützlich in der Melanom-Diagnostik erwiesen hat. Besonders bei in Formalin fixierten Präparaten hat der Marker eine hohe Sensitivität von über 89%, wohingegen die Spezifität lediglich bei 70-77% liegt. Dies liegt daran, dass S100 zusätzlich Schwannzellen, Chondrozyten, Langerhans-Zellen und Myoepithelzellen anfärbt. Das Protein ist in allen Subtypen des malignen Melanoms exprimiert. Im Gegensatz zu anderen immunhistochemischen Markern hat S100 auch in desmoplastischen Melanomen eine hohe Sensitivität (Weinstein et al. 2014; Ordonez 2014).

1.9 Serologische Marker

Durch die Bestimmung serologischer Marker ist es möglich, Informationen über Krankheitsfortschritte oder Therapieerfolge zu gewinnen, ohne sich eines invasiven Verfahrens bedienen zu müssen.

Neben der Funktion als immunhistochemischer Marker kann S100 ebenfalls als serologischer Marker eingesetzt werden. Es hat sich herausgestellt, dass der Marker besonders geeignet ist, fortgeschrittene Krankheitsstadien zu detektieren (Kaskel et al. 1999). Bei Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium konnte ein erhöhter S100 β -Spiegel in Zusammenhang mit Metastasierung, Rezidiven und verkürztem Gesamtüberleben gebracht werden (Tarhini et al. 2009; Weinstein et al. 2014). In einer multivarianten Analyse hat sich S100 β im Serum als ein unabhängiger prognostischer Faktor gezeigt, da es signifikant mit dem Überleben des Patienten korreliert (Mocellin, Zavagno, and Nitti 2008).

Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) wird als klinischer, serologischer Marker beim malignen Melanom eingesetzt. Es gilt als aussagekräftiger Marker, dessen Erhöhung mit einer erhöhten Tumorlast und einer schlechteren Prognose einhergeht (J. Zhang et al. 2015). Das Enzym wird vor allem freigesetzt, wenn es zu Zellschäden oder Zelltod kommt, wodurch es nicht spezifisch für Malignität ist, sondern auch im Rahmen von anderen pathologischen Vorgängen wie Infarkten, Entzündungsprozessen und Hämolyse im Serum erhöht ist (Vereecken et al. 2012). Es hat sich herausgestellt, dass Patienten mit fernmetastasierten Melanomen eine schlechtere Überlebensrate bei erhöhten Serum-Laktatdehydrogenase-Spiegeln haben, als Patienten in Stadium IV mit nicht erhöhten LDH-Spiegeln (Balch et al.

2009). Bei asymptomatischen Patienten mit lokalisierten Melanomen hingegen hat die Serum-LDH keine prognostische Aussagekraft (T. S. Wang et al. 2004). Daraus ergibt sich, dass der Serum-Marker LDH ein wichtiges klinisches Instrument ist, um eine Tendenz hinsichtlich der Tumorprogression vorauszusehen. LDH wurde zudem als Parameter in die AJCC-Tumorklassifikation aufgenommen.

C-reaktives Protein (CRP) ist ein Protein, das zu den Akute-Phase-Proteinen zählt, welche als unspezifische Marker bei Entzündungen, Infekten und Gewebsschäden vermehrt produziert werden. Darüber hinaus wurde ein erhöhtes CRP-Level mit verschiedenen malignen Prozessen und zusätzlich mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (Allin and Nordestgaard 2011). Ein CRP-Anstieg ist beim malignen Melanom assoziiert mit dem Krankheitsfortschritt von Stadium I, II oder III zu Stadium IV (Deichmann et al. 2004).

Melanoma-inhibiting activity (MIA) ist ein Protein, das als Wachstumsfaktor fungiert. Im Vergleich zu benignen, melanozytären Nävi und normaler Haut, weisen Melanome höhere MIA-Werte auf. Allerdings ist MIA nicht spezifisch für Melanome, da es zudem in anderen Neoplasien, in fortgeschrittenen Schwangerschaften und bei Kindern erhöht vorkommt (Bosserhoff, Kuster, and Hein 2004; Bosserhoff and Buettner 2002). Bei Melanompatienten korreliert die Höhe der MIA-Spiegel mit der Stadienzuordnung sowie mit der Tumorprogression und dem Ansprechen auf Therapien (Cao et al. 2007; Meral et al. 2001).

2. Therapie und Nachsorge

Da es sich beim malignen Melanom um einen sehr aggressiven Tumor handelt und die herkömmlichen Therapiemöglichkeiten nur wenig erfolgreich sind, hat sich die Forschung in den letzten Jahren intensiv mit der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten beschäftigt. Mit der Einführung von Checkpoint-Inhibitoren und den sogenannten „targeted therapies“ ist seit 2011 ein großer Fortschritt erzielt worden. Da diese Therapien allerdings nicht bei allen Patienten anschlagen und sich fortwährend Tumorresistenzen bilden, ist die Erweiterung effektiver Therapiemöglichkeiten erforderlich.

Unter kurativer Intention erfolgt zunächst eine radikale Exzision. Je nach Tumordicke wird der Tumor in entsprechendem Sicherheitsabstand zum Tumorrand exziiert, um Rezidivbildungen vorzubeugen und die Mortalität zu senken (Sladden et al. 2009). Ziel ist es, den Tumor im Gesunden zu entfernen. Bei Tumoren, die für eine Operation nicht geeignet sind, wird eine Radiotherapie des entsprechenden Areals empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016). Ab einer Tumordicke von 1 mm und ohne Hinweis auf lokoregionale Metastasen oder Fernmetastasen soll zur genaueren Stadienzuordnung und zur besseren Vorhersage des Krankheitsverlaufs eine Wächterlymphknoten-Biopsie erfolgen (Donald L Morton et al. 2014). Eine therapeutische Lymphadenektomie soll beim Nachweis einer lymphogenen Metastasierung ohne Hinweis auf Fernmetastasen durchgeführt werden (D L Morton et al. 1991).

Die Therapieempfehlung richtet sich nach den verschiedenen Stadien. Ab Stadium IIB/C und IIIA-C soll eine adjuvante Interferontherapie angeboten werden, ab Stadium IIIA-C kann eine Therapie mit Ipilimumab angeboten werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe 2018). Die chirurgische Therapie von Intransit- und Satellitenmetastasen ist empfohlen, wenn eine vollständige Entfernung der Metastasen möglich ist und keine Fernmetastasierung vorliegt (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016). Alternativ kann eine lokale Radiotherapie angeboten werden. Des Weiteren stehen lokale Verfahren wie die intratumorale Injektion von Interleukin 2 (Weide et al. 2011), die intratumorale Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin (Sersa et al. 2000; Byrne et al. 2005) und Talimogen laherparepvec (T-VEC) zur Verfügung (Andtbacka et al. 2015). Die Patienten sollten nach Möglichkeit in eine klinische Studie eingeschlossen werden.

Bei auf die Extremitäten beschränkt auftretenden Metastasen kann eine isolierte Extremitätenperfusion in Betracht gezogen werden (Moreno-Ramirez et al. 2010).

Im metastasierten Stadium stützt sich die Therapie neben Operation, Strahlentherapie und Immuntherapie auch auf eine zielgerichtete Behandlung, die sogenannte „targeted therapy“. Mit Einführung dieser neuen Therapieoption zeigte sich bei fortgeschrittenen Melanompatienten erstmals eine Steigerung der Lebenserwartung sowie der Lebensqualität. Während das mediane Überleben bei fortgeschrittenem Krankheitsprozess vor einiger Zeit noch bei 8-12 Monaten lag, ist dieses mittlerweile auf 24 Monate und länger gestiegen (Ugurel et al. 2016). Dies ist unter anderem dadurch möglich, dass gezielt mutierte Proteine angegriffen werden können.

2.1 Checkpoint-Inhibitoren

Das cytotoxic T lymphocyte Antigen (CTLA-4) war der erste Checkpoint-Rezeptor, der als therapeutisches Ziel in Betracht gezogen wurde. Dieses Protein wurde erstmals von Brunet et al. im Jahre 1987 beschrieben. Es handelt sich um ein Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie und ist überwiegend in aktivierten Lymphozyten (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) exprimiert. Darüber hinaus ist es an der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität beteiligt (Brunet et al. 1987). Damit es zur T-Zell-Aktivierung kommt, bedarf es verschiedener Signale. Wird der T-Zelle von einer antigen-präsentierenden Zelle ein Antigen präsentiert, bindet diese das Antigen über einen T-Zell-Rezeptor. Zur Aktivierung ist noch ein weiterer Stimulus nötig, der durch die Bindung von B7, einem Oberflächenmolekül der antigen-präsentierenden Zelle, an CD28 der T-Zelle gegeben wird. CTLA-4 fungiert als negativer Regulator dieser Stimulation. Es bindet B7 und verhindert somit die Aktivierung und Proliferation der T-Zelle (Mccoy et al. 1999). 2011 erzielte Ipilimumab als erste Immuntherapie eine Verbesserung der Gesamtlebensrate bei etwa 10-20% der Patienten (Hodi et al. 2010; Pasquali et al. 2018). Dabei handelt es sich um einen Antikörper, der an CTLA-4 bindet, das Protein dadurch inhibiert und somit die Aktivität der T-Zelle verstärkt (Camacho 2015). Dies bedeutet, dass der Tumor zum Ziel des Immunsystems wird, da seine Immuntoleranz aufgehoben wird.

Ein weiteres Standbein der Immuntherapie bildet die PD-1-Blockade. Programmed death-1 (PD-1) ist ein Molekül, welches ebenfalls an der Regulierung der T-Zell-Aktivität beteiligt ist. Es soll verhindern, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems überschießt bzw. Autoimmunprozesse unterbinden. Die PD-1-

Expression ist bei Krebspatienten zwar hochreguliert, die Aktivierung wird allerdings durch den Liganden PD-L1 inhibiert, der in variablem Ausmaß auf der Oberfläche von Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert ist. Die Tumorantigen-erkennenden T-Zellen, welche PD-1 überexprimieren, sind dysfunktional. Es hat sich herausgestellt, dass sich mittels spezifischer Antikörper die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 blockieren lässt und dadurch die biologische Funktion der T-Zellen zum Teil wiederhergestellt werden kann (Redman, Gibney, and Atkins 2016). Dies hat zur Folge, dass das Immunsystem den Tumor wieder erkennt und diesen abwehren kann. Nivolumab wurde im Juni 2015 als erster PD-1-Inhibitor für die Monotherapie des fortgeschrittenen Melanoms bei therapienaiven und vorbehandelten Patienten zugelassen, nachdem der Antikörper zuvor im Dezember 2014 als Zweitlinientherapie zugelassen worden war. Als weiterer Antikörper zur PD-1-Blockade wurde zudem Pembrolizumab im September 2014 zugelassen. Die beiden Antikörper erzielten im Vergleich zu Ipilimumab eine höhere objektive Ansprechrates (OAR), eine höhere progressionsfreie Zeit und ein verlängertes Gesamtüberleben (Schachter et al. 2017; Weber et al. 2017; Robert, Schachter, et al. 2015; Larkin et al. 2015). Mittlerweile sind Nivolumab und Ipilimumab als Kombinationstherapie von der europäischen Kommission zugelassen. Die Kombination geht, verglichen mit der alleinigen Therapie mit Ipilimumab, mit einer erhöhten OAR und einer erhöhten progressionsfreien Zeit einher (Postow et al. 2015).

2.2 Zielgerichtete Therapie („targeted therapy“)

Etwa 40-50% der Patienten in fortgeschrittenen Melanomstadium weisen eine BRAF^{V600} Mutation auf. Diese Mutation wirkt sich fördernd auf den Ras/Raf/MEK/ERK-MAP-Kinase-Signalweg aus, der Signale von der Zellmembran bis in den Nucleus transportiert. Im Nucleus kommt es daraufhin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Wachstumsfaktoren initiieren, den Eintritt in den Zellzyklus bewirken und die Zelle zur Differenzierung anregen (Peyssonnaud and Eychene 2001). Die BRAF^{V600}-Mutation macht die Kinaseaktivität, der durch das RAF-Gen codierten Tyrosinkinase unabhängig von ihrem Liganden, dem Ras-Protein. Somit kommt es zu einer unkontrollierten Signalübertragung (Davies et al. 2002). Gleichzeitig stellt die Mutation einen Angriffspunkt für Therapiestrategien dar. In diesen Fällen hat die Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren einen verlängernden Einfluss auf die progressionsfreie Zeit und das Gesamtüberleben,

indem sie den durch die Mutation autonomen Signalweg inhibieren. Vemurafenib war der erste BRAF-Inhibitor, der 2011 von der amerikanischen Food and Drug Administration und im Februar 2012 europaweit für die Monotherapie zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit einem nicht resezierbaren oder metastasierten Melanom und einer BRAF^{V600}-Mutation zugelassen wurde. Dabrafenib zählt ebenfalls zu den BRAF-Inhibitoren und wurde 2013 von der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA, European Medicines Agency) zugelassen. Trametinib ist ein MEK 1/2-Inhibitor und wird bei Patienten mit RAS- und RAF-Mutationen eingesetzt, da er die Gesamtüberlebensdauer und die progressionsfreie Zeit bei Patienten mit den entsprechenden Mutationen verlängert (Flaherty et al. 2012). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Dabrafenib und Trametinib in der Kombination überlegen sind, was zur Zulassung der Kombinationstherapie führte (Long et al. 2017; Robert, Karaszewska, et al. 2015). Dies gilt auch für Vemurafenib und Cobimetinib, einen weiteren MEK-Inhibitor (Larkin et al. 2014). Eine Mutation des c-KIT-Gens kommt vor allen in akrolentiginösen und Schleimhautmelanomen sowie bei Patienten mit chronisch-sonnengeschädigter Haut vor (Curtin et al. 2006). Bei diesen Mutationen haben sich KIT-Inhibitoren als wirksam erwiesen. Zu diesen gehören Imatinib, Dasatanib, Sunitinib und Nilotinib (Hodi et al. 2013; Cho et al. 2012). Diese werden in der Klinik eingesetzt, sind allerdings nicht von der FDA für diesen Zweck zugelassen (D. B. Johnson, Pollack, and Sosman 2016).

Die hohen Mutationsraten von Melanomen, ihre rapide Ausbildung von Resistenzen gegen eingesetzte Therapeutika sowie ein Nichtansprechen auf Immuntherapie und zielgerichtete Therapie erfordert die Weiter- und Neuentwicklung der Diagnostik und Therapiemöglichkeiten. Binimetinib ist ein weiterer MEK-Inhibitor, der momentan in Kombination mit dem BRAF-Inhibitor Encorafenib getestet wird. 14% der Patienten, die eine GNAQ und GNA11-Mutation aufwiesen, sprachen auf Selumetinib, einen weiteren MEK1/2-Inhibitor, an. Allerdings konnte keine Verlängerung des Gesamtüberlebens festgestellt werden (Isshiki et al. 2011; Carvajal et al. 2014). Eine weitere Strategie, die auf den Ras/Raf/MEK/ERK-MAP-Kinase-Signalweg abzielt, basiert auf dem Einsatz von ERK-Inhibitoren, die sich zurzeit noch in der Entwicklung befinden (D. B. Johnson, Pollack, and Sosman 2016). Glembatumumab vedotin ist ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, das sich gegen glycoprotein non-metastatic melanoma protein B (gpNMB) richtet. Dieses Protein ist häufig in kutanen und Schleimhautmelanomen sowie in Brustkrebs überexprimiert. Zurzeit wird unter

anderem getestet, ob sich dieses Protein als Zielstruktur therapeutisch nutzen lässt (Ott et al. 2014).

2.3 Talimogen laherparepvec (T-VEC)

Bei dieser Therapieform werden modifizierte Herpes-simplex-Viren Typ 1 direkt in den Tumor injiziert. Die Viren führen zu einer direkten zytotoxischen Wirkung und locken Immunzellen an (H. Liu et al. 2006). Diese Form der Therapie bietet sich zum Beispiel für Patienten an, die nur kutane und/oder subkutane Metastasen haben (Johnson, Puzanov, and Kelley 2015).

2.4 Zytotoxische Chemotherapie

Als Chemotherapeutika bei nicht resezierbaren Metastasen werden Dacarbazin, Temozolomid und Fotemustin eingesetzt (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016; Middleton et al. 2000). Da das maligne Melanom als wenig Chemotherapie-sensibel gilt und keine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt wurde, werden die Wirkstoffe für gewöhnlich nur bei therapierefraktären Fällen als palliative Therapie eingesetzt (D. B. Johnson, Pollack, and Sosman 2016).

Die Melanomnachsorge verläuft über 10 Jahre, in denen die Patienten in risikoadaptierten, definierten Abständen eine Eigenkontrolle vornehmen sowie stadiengerecht diagnostiziert werden (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016). Nach diesem Zeitraum erfolgen regelmäßige Selbstuntersuchungen sowie die jährliche Ganzkörperuntersuchung auf Zweitmelanome.

3. Praktische Grundlagen und Ziele des Projekts

Viele Eigenschaften der Neuralleistenzellen hinsichtlich Proliferation, Migration, Differenzierung und ihrer Interaktion mit der Umwelt können in Melanomzellen wiedergefunden werden (Bailey, Morrison, and Kulesa 2012). 2006 gelang es dem japanischem Stammzellforscher Shinya Yamanaka die ersten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zu generieren. Seit dem wurden die Techniken zur Reprogrammierung verfeinert und verbessert und eine Generierung von iPS-Zellen aus Melanozyten war erfolgreich (Utikal et al. 2009). In einer vorhergehenden Arbeit wurden exprimierte Gene in iPS-Zellen und Melanomzellen untersucht und verglichen. Zu diesem Zweck wurden induzierte pluripotente Stammzellen mittels eines spezifischen Differenzierungsmediums in Neuralleistenzellen überführt. Das Genexpressionsmuster der Neuralleistenzellen wurde anschließend mit dem Genexpressionsmuster von Melanomzellen verglichen. Das Ergebnis war eine Liste von Genen, die sowohl in Neuralleistenzellen, als auch in Melanomzellen hoch- bzw. herunterreguliert waren. Hierbei handelte es sich um eine Schnittmenge von 95 Genen (Wu et al. 2018). Als Grundlage für die vorliegende Arbeit wurden daraus 8 Gene ausgewählt, die in Neuralleiten- und Melanomzellen signifikant hochreguliert waren. Des Weiteren wurden CD271 als bekannter Neuralleistenmarker (Boiko et al. 2010) und Ki67 als bekannter Proliferationsmarker (Jurikova et al. 2016) untersucht. In dieser Arbeit soll überprüft werden, inwieweit anhand der Expression der 10 ausgewählten Gene in Melanomen von Patienten eine Aussage über die Prognose dieser Patienten getroffen werden kann.

Bei den Proteinen, die näher betrachtet werden sollen, handelt es sich um: CD271, GLDC, ERFFI1, TWIST, MSX1, Ki67, PTPRF, TNFRSF21, TNFRSF12A und IGFBP2.

CD271 ist ein bekannter Neuralleistenzellmarker, auch bekannt als Nerve-Growth-Factor-Rezeptor. Er wird in Geweben exprimiert, die von Zellen der Neuralleiste abstammen (Truzzi et al. 2015). Des Weiteren wurde die Expression des Proteins in Krebsstammzellen, darunter auch im malignen Melanom, nachgewiesen. Eine Überexpression in Tumorzellen fördert die Migration und Invasion und verleiht diesen dadurch stammzellähnliche Eigenschaften. Es gilt als essentiell für die Tumorentstehung und -differenzierung und ist maßgeblich an Metastasierungsprozessen beteiligt (Boiko et al. 2010).

Das Genprodukt des GLDC-Gens ist als Gylcin-Decarboxylase Teil eines Enzymkomplexes, welcher an der Synthese von Serin durch die Decarboxylierung von Glycin beteiligt ist (Go et al. 2014). Der Metabolismus steht im Zusammenhang mit der Proliferationsrate der Tumorzellen beim malignen Melanom (Jain et al. 2012). Es wird angenommen, dass GLDC als metabolisches Onkogen an der Tumorentstehung und am Fortschreiten der Melanompathogenese beteiligt ist (W. C. Zhang et al. 2012).

ERRFI1, auch bekannt als mitogen-inducible gene-6 (Mig-6), steht im Verdacht, Migrations- und Invasionsprozesse beim malignen Melanom zu beeinflussen. So soll eine Herunterregulierung von ERRFI1 in einem Epidermal-Growth-Factor (EGF)-reichen Umfeld migrationsfördernde Eigenschaften mit sich bringen (Vu et al. 2016).

TWIST ist ein bekannter Neuralleistenzellmarker (Clewes et al. 2011). Die Expression des TWIST-Gens hat vor allem Einfluss auf die Regulierung von Zellwanderung, -invasion und –überleben (Gheldof and Berx 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion des Transkriptionsfaktors TWIST eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumoren spielt (Yang et al. 2004; Tang et al. 2016).

MSX1 spielt eine Rolle bei der Determinierung von Neuralleistenzellen (Gouti, Briscoe, and Gavalas 2011). Es konnte gezeigt werden, dass MSX1 in Melanomzellen reaktiviert wird und diesen Vorläufer-ähnliche Eigenschaften verleiht, wie zum Beispiel Plastizität und Migrationspotential (Heppt et al. 2018).

Ki67 dient als Proliferationsmarker für sich teilende Zellen, sowohl in gesundem, als auch in Tumorgewebe (Gerdes et al. 1991). Aufgrund seiner Funktion als Proliferationsmarker wird Ki67 als prädiktiver und prognostischer Marker in Tumorgeweben, zum Beispiel beim Mammakarzinom, eingesetzt (Jurikova et al. 2016).

Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ F (PTPRF) ist an der Regulierung des EGRF-Signalweges beteiligt. In Melanomzellen ist er sowohl in Primarien, als auch in Metastasen stark exprimiert, wohingegen er in gesunden Melanozyten nicht oder nur wenig exprimiert ist (W. Liu, Peng, and Tobin 2013).

TNFRSF21 gehört zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie und ist an Gewebsreparaturmechanismen, Angiogenese und Zellmigration beteiligt (Cabal-Hierro and Lazo 2012; Jakubowski et al. 2002; Girgenrath et al. 2006; Winkles, Tran,

and Berens 2006). Darüber hinaus spielt der Rezeptor eine Rolle bei der Tumorentstehung, indem er immunologische und Entzündungsprozesse initiiert sowie an Tumorresistenzentwicklung beteiligt ist (Winkles, Tran, and Berens 2006).

TNFRSF12A ist ebenfalls Teil der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie. Neben normalen physiologischen Funktionen konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass das Protein eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt (Schmidt et al. 2003). Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges, welcher eine wichtige Funktion in der Tumorentstehung spielt (Pan et al. 1998; Winkles, Tran, and Berens 2006).

IGFBP2 gehört zur Superfamilie der Insulin-like growth factor binding proteins. Es wird hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert, findet sich darüber hinaus aber auch in adultem Gewebe (Shin et al. 2017). Das Protein spielt nicht nur eine Rolle bei der Proliferation, Apoptose und Migration von Zellen während der Embryogenese, sondern auch in Tumorzellen (Yao et al. 2016).

4. Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden von 54 Patienten insgesamt 54 Proben untersucht. Es wurden Patienten eingeschlossen, bei denen zwischen 1989 und 2013 ein malignes Melanom diagnostiziert wurde. Die Patienten erhielten keine das Überleben signifikant verlängernde Therapie. Unter den 55 Patienten befanden sich 21 Frauen und 34 Männer. Die Auswahl des Patientenkollektivs erfolgte anhand klinischer Daten. Das Patientenkollektiv wurde in die jeweiligen Gruppen anhand folgender Kriterien eingeteilt: In Gruppe I wurden Patienten, die innerhalb von 12 Monaten nach Fernmetastasierung starben, den Patienten gegenübergestellt, die nach Fernmetastasierung über 30 Monate überlebten (Kurzzeitüberleber- versus Langzeitüberleber-Gruppe). Darüber hinaus wurden von den involvierten Patienten klinische Daten gesammelt. Dazu gehörten die Tumordicke des Primärmelanoms nach Breslow und das Clark-Level. Es wurde erfasst, in welchem Krebsstadium sich die Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose befanden und in welchem Zeitraum die erste Metastase auftrat. Zusätzlich wurden LDH-Spiegel im Serum +/- einen Monat nach Diagnosestellung Stadium IV und S100 β -Spiegel im Serum +/- einen Monat nach Diagnosestellung Stadium IV vermerkt. Des Weiteren wurden klinische Angaben hinsichtlich weiterer Krebserkrankungen berücksichtigt.

Die Gruppe I umfasst insgesamt 32 Patienten mit Fernmetastasen, die entweder innerhalb von 12 Monaten verstarben (Kurzzeitüberleber-Gruppe) oder länger als 30 Monate überlebten (Langzeitüberleber-Gruppe). In der Kurzzeitüberleber-Gruppe befanden sich 12 Patienten, darunter vier Frauen und acht Männer. Das Durchschnittsalter der Kurzzeitüberleber-Gruppe betrug 52 Jahre bei Diagnose eines malignen Melanoms. Zwei Patienten wurde im Stadium I diagnostiziert, drei der Patienten im Stadium II, fünf im Stadium III und zwei Patienten zeigten bereits bei Diagnose Fernmetastasen, so dass sie als Stadium IV klassifiziert wurden. Die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow betrug in der Gruppe der Kurzzeitüberleber 2.8 mm, wobei von drei Patienten keine Angaben vorlagen. Ein Primärmelanom wurde dem Clark-Level zwei, fünf Primarien dem Level vier und eins dem Level fünf zugeordnet. Von fünf der untersuchten Patienten in der Kurzzeitüberleber-Gruppe waren keine Angaben zum Clark-Level verfügbar. In der

Gruppe I wurde nur Gewebe von Metastasen untersucht. Fünf der untersuchten Metastasen wurden aus der Haut entnommen, zwei aus Weichteilgewebe und eine aus dem subkutanen Gewebe. Darüber hinaus wurden zwei Lungen-, eine Knochen- und eine Lymphknotenmetastase untersucht. Der mittlere S-100-Serumspiegel +/- einen Monat nach Eintritt in Stadium IV betrug 0.17 µg/L, wobei auch hier zwei klinische Angaben nicht zur Verfügung standen. Der mittlere Serum-LDH-Spiegel +/- einen Monat nach Eintritt in Stadium IV in der Kurzzeitüberleber-Gruppe betrug 398.2 U/L, wobei von zwei Patienten die Angaben nicht verfügbar waren. In dieser Gruppe hatten zwei Patienten weitere Krebserkrankungen.

Der Langzeitüberleber-Gruppe gehörten 20 Patienten an, darunter elf Frauen und neun Männer. Das durchschnittliche Alter bei Diagnose betrug 61 Jahre. Drei der Patienten wurden im Stadium I diagnostiziert, ein Patient im Stadium I-II, zehn der Patienten im Stadium II, vier im Stadium III und einer im Stadium IV. Von einer Patientin lagen keine Angaben hinsichtlich der Stadieneinteilung zum Diagnosezeitpunkt vor. Die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow betrug in der Gruppe der Langzeitüberleber 3.3 mm. Von vier Patienten lagen keine Angaben hinsichtlich der Tumordicke des Primarius vor. Ein Primarius wurde dem Clark-Level zwei, zwei dem Level drei, dreizehn dem Level vier und einer dem Level fünf zugeordnet. Von drei Patienten lagen keine klinischen Angaben zum Clark-Level vor. Es wurden zwölf Metastasen der Haut, eine der Unterhaut und sechs Lymphknoten- sowie eine Lungenmetastase untersucht. Der mittlere S-100-Serumspiegel +/- einen Monat nach Eintritt in Stadium IV betrug 0.07µg/L, wobei auch hier sechs klinische Angaben nicht zur Verfügung standen. In der Langzeitüberleber-Gruppe betrug der mittlere Serum-LDH-Spiegel +/- einen Monat nach Eintritt in Stadium IV 238.2 U/L. Von fünf Patienten waren keine klinischen Angaben verfügbar. In dieser Gruppe waren bei drei Patienten weitere Krebserkrankungen bekannt (*Tabelle 1*).

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten im Stadium IV, die innerhalb von 12 Monaten starben (Kurzzeitüberleber-Gruppe) und der Patienten, die über 30 Monate überlebten (Langzeitüberleber-Gruppe)

Patienten-nummer	Geschlecht	Alter bei Erst-diagnose	Stadium bei Erst-diagnose	Tumordicke nach Breslow des Primarius (in mm)	Clark Level des Primarius	M-Klassifikation (2009)	Monate in Stadium I, II bis Metastasierung	Monate zwischen Eintritt Stadium IV und Tod	Lokalisation der untersuchten Metastase
Kurzzeitüberleber-Gruppe: Patienten im Stadium IV, die innerhalb von 12 Monaten verstarben									
1	männlich	72	III	n.b.	n.b.	M1b	0	9	Weichteilgewebe
2	männlich	51	II	6	5	M1b	14	11	Lungengewebe
3	männlich	23	III	n.b.	n.b.	M1a	0	11	Unterhaut
4	weiblich	54	I	1.7	4	M1c	37	9	Knochen
5	männlich	41	II	1.4	n.b.	M1a	13	5	Haut
6	männlich	51	III	2.8	4	M1b	0	10	Haut
7	männlich	43	IV	1.8	4	M1c	0	7	Lymphknoten
8	weiblich	69	IV	n.b.	n.b.	M1c	0	7	Haut
9	männlich	51	III	2.7	n.b.	M1c	0	7	Weichteilgewebe
10	weiblich	78	II	4.3	4	M1b	0	6	Haut
11	weiblich	67	III	3.5	4	M1b	0	11	Lungengewebe
12	männlich	28	I	0.7	2	M1b	116	6	Haut
Langzeitüberleber-Gruppe: Patienten im Stadium IV, die länger als 30 Monate überlebten									
13	weiblich	47	II	n.b.	n.b.	M1a	n.b.	60	Haut
14	weiblich	70	n.b.	n.b.	4	M1a	19	61	Haut
15	männlich	55	III	1.8	4	M1a	33	43	Haut
16	männlich	62	I	1.9	3	M1b	9	34	Lungengewebe
17	weiblich	51	II	7.0	4	n.b.	0	37	Lymphknoten
18	weiblich	60	III	3.2	4	M1a	0	47	Haut
19	männlich	52	IV	n.b.	n.b.	M1a	74	49	Unterhaut
20	männlich	60	II	5.0	4	M1a	0	58	Haut
21	weiblich	75	II	11.7	5	M1b	105	70	Lymphknoten
22	männlich	75	II	1.3	2	M1c	0	58	Haut
23	weiblich	54	II	2.0	4	M1c	0	61	Lymphknoten
24	weiblich	84	III	1.6	4	M1a	10	43	Haut
25	männlich	34	II	2.5	4	M1a	0	40	Haut
26	männlich	47	III	3.8	4	M1a	0	45	Lymphknoten
27	männlich	70	I	1.4	3	n.b.	1	68	Haut
28	weiblich	68	I-II	n.b.	n.b.	M1c	3	80	Lymphknoten
29	männlich	66	II	4.5	4	M1b	1	104	Lymphknoten
30	weiblich	66	II	5.0	4	M1a	1	61	Haut
31	weiblich	61	II	3.1	4	M1c	n.b.	31	Haut
32	weiblich	68	I	1.5	4	n.b.	n.b.	80	Haut
n.b. = nicht bestimmt									

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit Patienten mit Primärmelanomen, die eine Primärdicke von über 2.0 mm aufwiesen, hinsichtlich der vergangenen Zeit bis zum Auftreten der ersten Metastase untersucht. Daraus ergab sich ein Patientenkollektiv (Gruppe II), welches eine Tumordicke von über 2.0 mm aufwies und innerhalb von 12 Monaten eine Metastase entwickelte (Hochrisikogruppe A) und eine weitere Gruppe, die über 30 Monate metastasefrei blieb (Hochrisikogruppe B). Die Gruppe II umfasste insgesamt 23 Patienten. In der Hochrisikogruppe A befanden sich 16 Patienten, darunter vier Frauen und 12 Männer. Das durchschnittliche Alter der Hochrisikogruppe A betrug 76 Jahre bei Diagnosestellung. Es wurden nur Primarien untersucht, davon 15 Primärmelanome der Haut und eins der Schleimhäute. Die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow lag in dieser Gruppe bei 5 mm. Zwei der Primarien wurden dem Clark-Level drei, neun dem Level vier und zwei dem Level fünf zugeordnet. Von drei Primarien liegen keine Angaben zum Clark-Level vor. Acht der Primärmelanome zeigten Ulzerationen. Zwei zeigten keine Ulzerationen und in sechs Fällen wurde der Ulzerationsstatus nicht beschrieben. Neun der Patienten wurden im Stadium II diagnostiziert und sieben im Stadium III. Die Hochrisikogruppe B bestand aus sieben Patienten, zwei davon männlich und fünf weiblich. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug 68 Jahre. Alle der untersuchten Primärmelanome der Hochrisikogruppe B wurden der Haut entnommen. Die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow betrug 2.5 mm. Fünf der untersuchten Primarien in der Hochrisikogruppe B wiesen ein Clark-Level von 4 auf, von zwei Primarien lagen keine Angaben zum Clark-Level vor. Drei der Primarien zeigten Ulzerationen, wohingegen drei keine Ulzerationen aufwiesen. Von einem Primärmelanom lag keine Angabe hinsichtlich des Ulzerationsstatus vor. Alle der in dieser Gruppe untersuchten Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose im Stadium II (*Tabelle 2*).

Die Klassifikation erfolgte anhand der Kriterien der American Joint Committee on Cancer (AJCC) von 2009.

Tabelle 2: Klinische Daten der Patienten mit Hochrisiko-Primarien, die innerhalb kurzer Zeit Metastasen entwickelten (Hochrisikogruppe A) und Patienten, die keine bzw. spät Metastasen entwickelten (Hochrisikogruppe B)

Patienten-nummer	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Monate in Stadium II bis zur Metastasierung	Monate zwischen Erstdiagnose und untersuchter Metastase	Tumor	Lokalisation	Tumor-dicke nach Breslow des Primarius (in mm)	Clark Level des Primarius	Mitoserate (Mitosen/mm ²) des Primarius	Ulzeration des Primarius	Stadium bei Erstdiagnose
Hochrisikogruppe A: Patienten mit Primärmelanom ≥ 2 mm, die innerhalb von 12 Monaten eine Metastase entwickelten											
33	männlich	71	6	0	Primarius	Schleimhaut	5	n.b.	n.b.	ja	II
34	weiblich	76	1	0	Primarius	Haut	9.2	n.b.	n.b.	ja	II
35	männlich	61	0	0	Primarius	Haut	6.8	4	n.b.	ja	III
36	weiblich	64	0	0	Primarius	Haut	3.5	n.b.	n.b.	ja	II
37	männlich	40	0	0	Primarius	Haut	3.6	3	6	ja	III
38	männlich	53	0	0	Primarius	Haut	3.5	3	n.b.	nein	III
39	männlich	75	5	0	Primarius	Haut	2.8	4	8	nein	II
40	männlich	90	6	0	Primarius	Haut	7.7	5	9	ja	II
41	weiblich	81	1	0	Primarius	Haut	3.5	4	n.b.	ja	II
42	männlich	65	5	0	Primarius	Haut	6.5	4	10	ja	II
43	männlich	41	0	0	Primarius	Haut	3.2	4	n.b.	n.b.	III
44	männlich	88	0	0	Primarius	Haut	5	4	n.b.	n.b.	III
45	männlich	51	0	0	Primarius	Haut	2.8	4	n.b.	n.b.	III
46	männlich	77	5	0	Primarius	Haut	9	5	n.b.	n.b.	II
47	männlich	66	3	0	Primarius	Haut	4.5	4	n.b.	n.b.	II
48	weiblich	67	0	0	Primarius	Haut	3.5	4	n.b.	n.b.	III
Hochrisikogruppe B: Patienten mit Primärmelanom ≥ 2 mm, die innerhalb von 30 Monaten keine Metastase entwickelten											
49	männlich	65	40	0	Primarius	Haut	2.1	n.b.	2	n.b.	II
50	männlich	78	31	0	Primarius	Haut	2.5	n.b.	n.b.	ja	II
51	männlich	75	47	0	Primarius	Haut	2.6	4	n.b.	nein	II
52	weiblich	66	34	0	Primarius	Haut	2.4	4	n.b.	ja	II
53	männlich	48	39	0	Primarius	Haut	2.2	4	7	nein	II
54	weiblich	76	32	0	Primarius	Haut	3.3	4	n.b.	nein	II
55	männlich	70	39	0	Primarius	Haut	2.3	4	n.b.	ja	II
n.b. = nicht bestimmt											

4.2 Verarbeitung der Tumorproben

Die Operationsresektate wurden in 4 %-igen Formalin gepuffert und anschließend bis zur weiteren Verwendung in Paraffin eingebettet. Daraufhin erfolgte die Herstellung von 0,9 µm dicken Paraffinschnitten, die mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt wurden. Die Färbung der Schnitte erfolgte im LeicaAutoStainer XL. Zunächst wurden die Gewebeproben vier Mal für jeweils eine Minute in Xylol gebadet. Daraufhin erfolgt die Dehydratation mittels einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 96%, 80% und 70%) für jeweils eine Minute. Danach wurden die Präparate für etwa eine Minute mit destilliertem Wasser behandelt, um anschließend für vier Minuten mit Hämatoxylin inkubiert zu werden. Es erfolgte ein weiteres Bad in destilliertem Wasser für etwa 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben mit 0,1% Eosin für 2 Minuten angefärbt und abermals mit destilliertem Wasser für etwa eine halbe Stunde gewaschen. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 80% für 30 Sekunden, zwei mal 96% für jeweils weitere 30 Sekunden, zwei mal 99% für jeweils eine Minute. Daraufhin erfolgte ein Bad für eine Minute in Xylol bevor die Proben mit Eukitt eingedeckt wurden. Anhand der Färbung wurden repräsentative Bereiche des Tumorgewebes für weiterführende immunhistochemische Untersuchungen ausgewählt und markiert. Die Identifikation der repräsentativen Bereiche erfolgte unter dem Mikroskop anhand histologischer Kriterien wie zum Beispiel atypische oder nekrotisierende Melanozyten und Mitosefiguren.

4.3 TMA-Anfertigung

Tissue microarray (TMA) ist ein Verfahren, das die Gewinnung von zahlreichen Daten erlaubt, bei gleichzeitig minimalem Gewebsverbrauch, indem Gewebeproben verschiedener Herkunft auf einem Objektträger gesammelt werden. Hierfür werden Paraffinstanzen variablen Durchmessers aus Paraffinblöcken entnommen und dann in einen „Akzeptor-Paraffinblock“ in dafür vorgesehene, zylinderförmige Hohlräume eingefügt. Somit sind die ausgestanzten Gewebszylinder verschiedener Herkunft in einem Paraffinblock gesammelt. Von diesem können Schnitte gefertigt werden. Die Schnitte werden auf Objektträgern fixiert und stehen zur weiteren Prozessierung bereit. Somit kann eine große Ansammlung verschiedener Proben auf einmal überblickt und für weitere Untersuchungen (z.B. Immunhistochemie) verwendet werden (Kononen et al. 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Stanzgröße von 2 mm Durchmesser gewählt. Es wurden fünf Akzeptor-Paraffinblöcke bestückt, wobei in jedem Block Platz für 96 Gewebszylinder war. Von den 54 Proben wurden bis zu vier Stenzen entnommen und ausgewertet.

Anschließend erfolgte die Färbung der TMA-Objektträger mit verschiedenen Antikörpern.

4.4 Verarbeitung der TMAs

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	gewonnen aus	pH und Verdünnung	Herkunft
Anti-TNFRSF12A	Kaninchen, polyklonal	pH 9.0, 1:10	Atlas Antibodies
Anti-TNFRSF21	Kaninchen, polyklonal	pH 6.0, 1:50	Atlas Antibodies
Anti-TWIST	Kaninchen, polyklonal	pH 6.0, 1:200	abcam
Anti-Human CD271	Maus	pH 6.0, 1:300	BD Pharmingen™
Anti-MSX1	Kaninchen, polyklonal	pH 9.0, 1:50	abcam
Anti-Ki67	Kaninchen, polyklonal	pH 6.0, 1:150	abcam
Anti-GLDC	Kaninchen, polyklonal	pH 9.0, 1:10	Atlas Antibodies
Anti-ERRFI1	Kaninchen, polyklonal	pH 9.0, 1:50	Atlas Antibodies
IGFBP2 Antibody	Kaninchen, polyklonal	pH 9.0, 1:25	Cell Signaling Technology®

Verwendete Materialien:

Chemikalien

Dako Antibody Diluents

Dako Kit, K4009 mit:

- Peroxidase Block
- Labelled Polymere-HRP-Anti-Rabbit
- AEC + Substrate Chromogen
- AEC + Substrate Chromogen

Dako Kit, K4005 mit:

- Peroxidase Block
- Labelled Polymere-HRP-Anti-Mouse

Destilliertes Wasser

EtOH

Haematoxylin

Bezugsquelle

Dako; Art.-Nr. S0809

Dako; Art.-Nr. K4009

Dako; Art.-Nr. K4005

Fresenius KABI; Art.-Nr., 13KBP211

Carl Roth GmbH + Co. KG; Art.-Nr. K928.4

Merck KGaA; Art.-Nr., 1.09249.2500

HIER Citrate Buffer pH 6,0	Zytomed; Art.-Nr. ZUC028-500
Tris Buffered Saline with Tween 20	Sigma-Aldrich; Art.-Nr. P7949-500ML
TRIS Wash Buffer (20 X) (TBS)	Zytomed; Art.-Nr. ZUC028-500
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Art.-Nr., 26625

Verbrauchsmaterialien:

Dako Mountain Medium	Dako; Art.-Nr. S3025
Dako-Pen	Dako; Art.-Nr. S2002
Deckgläser (24x60mm)	Langenbrinck GmbH; Art.-Nr. 01-2460
Objektträger	Langenbrinck GmbH; Art.-Nr. 03-0060

Verwendete Geräte:

Brutschrank	Heraeus Instruments
Humidity-Box	Simport
Kühlschrank 4°C	Liebherr
LeicaAutoStainer XL	Leica ST5010
NANO ZOOM DIGITAL PATHOLOGY	Hamamatsu
Schneidegerät	Leica RM 2065

Software:

NDP NanoZoomer Digital Pathology

Von den TMA-Paraffinblöcken wurden analog zum oben beschriebenen Verfahren Schnitte angefertigt, die wie folgt weiter verarbeitet wurden: Zunächst wurden die Proben drei Mal für fünf Minuten in Xylol gebadet. Anschließend wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (90%, 80% und 70% für jeweils drei Minuten) in ein wässriges Milieu überführt. Es folgte das Abwaschen der Objektträger mit destilliertem Wasser für etwa 15 Sekunden bevor die Proben für 5-10 Minuten in ein Bad aus TBS-Puffer gegeben wurden. Daraufhin wurden die Proben bei 100°C im Wasserbad in HIER Citrat Buffer pH 6.0 gekocht. Es folgte eine Abkühlungszeit von 20-30 Minuten. Mit einem Dako-Pen wurden die Proben umfahren, um das Abfließen der im Folgenden verwendeten Reagenzien zu verhindern. Nach dem Abwaschen mit

destilliertem Wasser für etwa 15 Sekunden erfolgten zwei weitere Bäder im TBS-Puffer für jeweils fünf Minuten. Daraufhin wurden die Proben in ein weiteres Bad aus 1% TBS-Tween20-Puffer für weitere 5 Minuten gegeben. Nachdem die Präparate für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Humidity box zusammen mit einer Blockierungslösung (Peroxidase Block) inkubiert wurden, erfolgten zwei TBS-Puffer-Anwendungen für jeweils 5 Minuten um anschließend für weitere 5 Minuten im 1% TBS-Tween20-Puffer zu verbleiben. Über Nacht ruhten die Proben bei 4°C in einer Humidity box, nachdem sie mit der Dako Antikörperverdünnung (entsprechendes Verdünnungsverhältnis siehe *Tabelle 3*) beschichtet wurden. In einem Kontrollansatz wurde für die Negativ-Kontrolle kein Antikörper hinzugefügt. Anschließend erfolgten zwei weitere Inkubationen im TBS-Puffer für jeweils fünf Minuten und weitere fünf Minuten im 1% TBS-Tween20-Puffer. Anschließend erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers für 60 Minuten. Für Anti-GLDC, Anti-ERRFI1, Anti-MSX1, Anti-TNFRSFR12a, Anti-Ki67, Anti-PTPRF, Anti-TNFRSFR21, Anti-TWIST und Anti-IGFBP2 wurde das Dako EnVision™ System-HRP Dako Kit Rabbit verwendet. Für Anti-CD271 kam das Kit Mouse zum Einsatz. Es folgen zwei weitere Inkubationen in TBS-Puffer für jeweils fünf Minuten. Für 10-30 Minuten wurden die Präparate mit einem ACE-Tropfen behandelt, bevor sich eine HE (1:10) Färbung für 10 Minuten anschloss. Darauf folgte eine letzte Spülung mit destilliertem Wasser. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem Dako Mounting Medium und Deckglas blasenfrei abgedeckt.

4.5 Digitalisierung der Daten und Auswertung

Zur weiteren Verarbeitung wurden die gefärbten TMAs eingescannt (Gerät: Hamaratsu nano zoom digital pathology) und mithilfe des Software-Programms NDP NanoZoomer Digital Pathology gesichtet. Die Auswertung der Daten erfolgte (mit Ausnahme der Ki67-Auswertung) anhand der SOP - Tissue Microarray Analysis- Methodik (Wagner et al. 2015). Nach diesem Schema wurden Werte für die Färbungsintensität vergeben. Die Intensität wurde in aufsteigender Reihe in schwache = 1 Punkt, mäßige = 2 Punkte und starke = 3 Punkte Färbungsintensität eingeteilt. Neben der Intensität wurden zusätzlich Werte von 0-4 für die Quantität der angefärbten Zellen vergeben. Die Bewertung erfolgte anhand des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Zellen bezogen auf die gesamte Stanze (*Tabelle 4*). Die Endwertung ergab sich aus dem Produkt der beiden zuvor definierten Werte, dem sogenannten

immunhistochemischen Wert (IHC-Wert). Die Auswertung der Ki67-Färbung erfolgte nach dem prozentualen Anteil der positiv gefärbten Tumorzellkerne gemessen an der Gesamtzahl der Tumorzellen auf der Stanze.

Die Analyse wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, wobei eine Auswertung blind erfolgt.

Tabelle 4: TMA-Bewertungskriterien

Färbungsintensität		Prozentualer Anteil gefärbter Zellen	
1	Schwache Färbungsintensität	0	Keine positiven Zellen
2	Mäßige Färbungsintensität	1	1-25% positive Zellen
3	Starke Färbungsintensität	2	26-50% positive Zellen
		3	51-75% positive Zellen
		4	76-100% positive Zellen

Die *Abbildungen A und B* im Anhang geben einen Überblick über die Färbintensitäten der jeweiligen Antikörper.

Wie oben beschrieben, wurden bis zu vier Stenzen pro Tumorprobe entnommen. Für jeden Antikörper wurden daraufhin in jeder Gruppe (Kurzzeitüberleber-Gruppe, Langzeitüberleber-Gruppe, Hochrisikogruppe A und Hochrisikogruppe B) der Mittelwert aus den einzelnen Stenzen für jede Tumorprobe, der Median und das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall berechnet. Mit Hilfe des doppelten t-Tests wurde anschließend mit einem Signifikanzniveau von 95% ermittelt, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Kurzzeitüberleber- und Langzeitüberleber-Gruppe sowie zwischen Hochrisikogruppe A und Hochrisikogruppe B besteht. Da Mediane und Mittelwerte annähernd gleich waren, konnte von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden. Zur Auswertung der Färbungen mit Anti-Ki-67 und Anti-IGFBP2 in der Hochrisikogruppe kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz, da die Daten in diesen Fällen nicht gleich verteilt waren. Anschließend erfolgte mittels logistischer Regression die Ermittlung eines Grenzwertes für die signifikanten Antikörper. Anhand dieses Grenzwertes kann berechnet werden, um wie viel höher das Risiko des Patienten ist der prognostisch schlechteren Gruppe zugeordnet zu werden. Darüber hinaus wurde die Validität dieses Zuordnungsmodells geprüft, indem die rechnerisch

ermittelte Zuordnungswahrscheinlichkeit anhand des Grenzwertes mit der beobachteten Zuordnung verglichen wurde.

5. Ergebnisse

5.1. Vergleich Kurzzeitüberleber- versus Langzeitüberleber-Gruppe

Meine Analysen der im Methodenteil vorgestellten Gruppen erbrachten folgende Ergebnisse. Zunächst wurden die Daten der Patientengruppe mit Fernmetastasierung, die innerhalb von 12 Monaten starben (Kurzzeitüberleber-Gruppe), den Daten der Patientengruppe mit Fernmetastasierung, die über 30 Monate überlebten (Langzeitüberleber-Gruppe), gegenübergestellt. Als Grundlage wurde hierfür der immunhistochemische Wert (IHC) genommen. Dieser ist das Produkt aus Färbungsintensität und Quantität der angefärbten Zellen. Je stärker die Proteinexpression im Tumor, die durch den jeweiligen Antikörper sichtbar gemacht wird, desto höher fällt der IHC aus. Um eine Aussage über die Prognose eines Melanom-Patienten im Stadium IV treffen zu können, eignen sich in der Gruppe I folgende Antikörper: Anti-CD271, Anti-GLDC und Anti-ERRFI1.

Tabelle 5: Immunhistochemische Werte für jeden Antikörper (Gruppe I)

Patienten- nummer	Anti- CD271	Anti- GLDC	Anti- ERRFI1	Anti- TWIST	Anti- MSX1	Anti- Ki-67	Anti- PTPRF	Anti- TNFRSF21	Anti- TNFRSF12A	Anti- IGFBP2
Kurzzeitüberleber-Gruppe: Patienten im Stadium IV, die innerhalb von 12 Monaten verstarben										
1	8.50	8.00	9.00	8.75	8.50	3.00	7.00	9.00	11.00	2.67
2	9.50	9.00	10.00	9.00	10.00	8.75	3.75	8.00	10.00	1.50
3	12.00	12.00	10.50	12.00	10.50	3.00	8.00	12.00	12.00	4.00
4	12.00	8.00	12.00	12.00	12.00	2.75	10.00	11.00	9.75	3.00
5	12.00	9.00	12.00	9.00	12.00	1.00	12.00	12.00	12.00	8.00
6	10.67	10.00	12.00	9.00	10.00	12.50	6.50	9.00	12.00	6.50
7	8.00	8.00	8.00	10.50	12.00	25.00	8.00	10.00	12.00	10.00
8	0.00	4.00	12.00	0.00	0.00	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	8.50	8.00	9.00	8.75	8.50	3.00	7.00	9.00	11.00	2.67
10	12.00	12.00	10.50	12.00	10.50	3.00	8.00	12.00	12.00	4.00
11	12.00	8.00	12.00	12.00	12.00	2.75	10.00	11.00	9.75	3.00
12	10.67	9.67	12.00	12.00	12.00	12.50	12.00	12.00	12.00	10.00
Langzeitüberleber-Gruppe: Patienten im Stadium IV, die länger als 30 Monate überlebten										
13	7.00	8.00	6.00	8.00	6.00	9.33	8.00	8.00	8.00	2.00
14	6.00	6.00	4.50	8.00	8.50	1.00	8.00	3.50	6.00	0.00
15	8.00	12.00	8.00	12.00	10.00	10.00	12.00	12.00	6.00	10.00
16	8.00	8.00	8.50	8.00	8.00	10.00	8.00	8.00	12.00	8.00
17	7.00	6.50	6.67	12.00	8.00	6.00	7.50	11.00	8.00	5.50
18	8.00	8.00	8.00	10.00	11.00	9.00	5.75	11.00	12.00	5.50
19	4.00	7.00	7.00	8.00	10.00	4.50	7.00	11.00	9.00	6.00
20	0.00	8.00	2.00	4.00	8.00	2.00	4.00	6.00	8.00	6.00
21	5.75	7.00	8.00	11.00	7.50	2.00	7.00	10.00	7.00	6.00
22	6.67	6.33	8.00	6.33	8.67	15.00	10.67	12.00	6.00	3.67
23	1.50	5.00	7.00	6.00	10.00	5.50	7.00	10.00	7.00	8.00
24	1.50	5.33	2.00	4.00	1.50	13.50	5.00	1.00	10.00	8.00
25	5.33	9.33	6.67	9.33	8.00	3.33	8.00	9.33	8.00	3.67
26	7.00	3.50	9.75	7.25	6.25	1.50	3.50	6.75	5.25	6.00
27	5.50	9.33	5.33	8.25	10.00	8.75	8.00	10.67	6.50	2.67
28	4.00	4.00	8.67	8.00	9.33	1.33	1.33	6.67	8.67	6.00
29	10.67	8.00	5.33	10.67	8.00	26.00	4.00	8.00	12.00	5.33
30	11.00	9.00	11.00	6.00	10.00	7.75	5.00	9.00	12.00	3.75
31	4.50	6.67	4.67	7.33	7.00	30.00	4.00	6.00	10.00	7.67
32	0.00	0.00	n.b.	12.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00
n.b. = nicht bestimmt										

Anti-CD271

Der mittlere IHC-Wert für den Antikörper gerichtet gegen CD271 betrug in der Kurzzeitüberleber-Gruppe 8.81 (6.61-11.0; KI 95%) verglichen mit 5.57 (4.12-7.02; KI 95%) in der Langzeitüberleber-Gruppe. Daraus ergab sich ein p-Wert von 0.01. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte somit ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Kurzzeitüberleber- und Langzeitüberleber-Gruppe detektiert werden. Der berechnete Grenzwert für diesen Antikörper betrug 8 (*Abbildung 1*). Für diesen Grenzwert errechnete sich ein p-Wert von 0.02, womit der IHC-Wert zu einem signifikanten Werkzeug in der Prognosebestimmung wird. Daraus ergibt sich für Patienten mit einem IHC-Wert >8 für den Antikörper gegen CD271 ein 12-fach erhöhtes Risiko der Kurzzeitüberleber-Gruppe zugehörig zu sein und somit eine schlechte Prognose zu haben. Dieses Modell ist zu 80% valide.

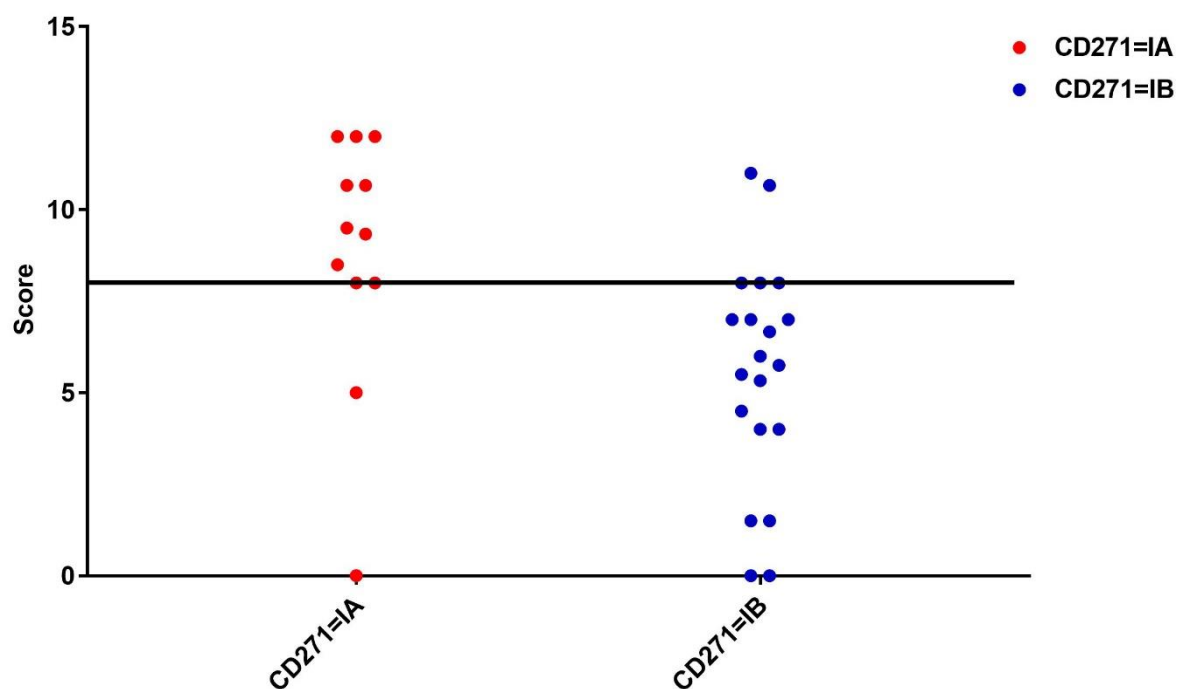
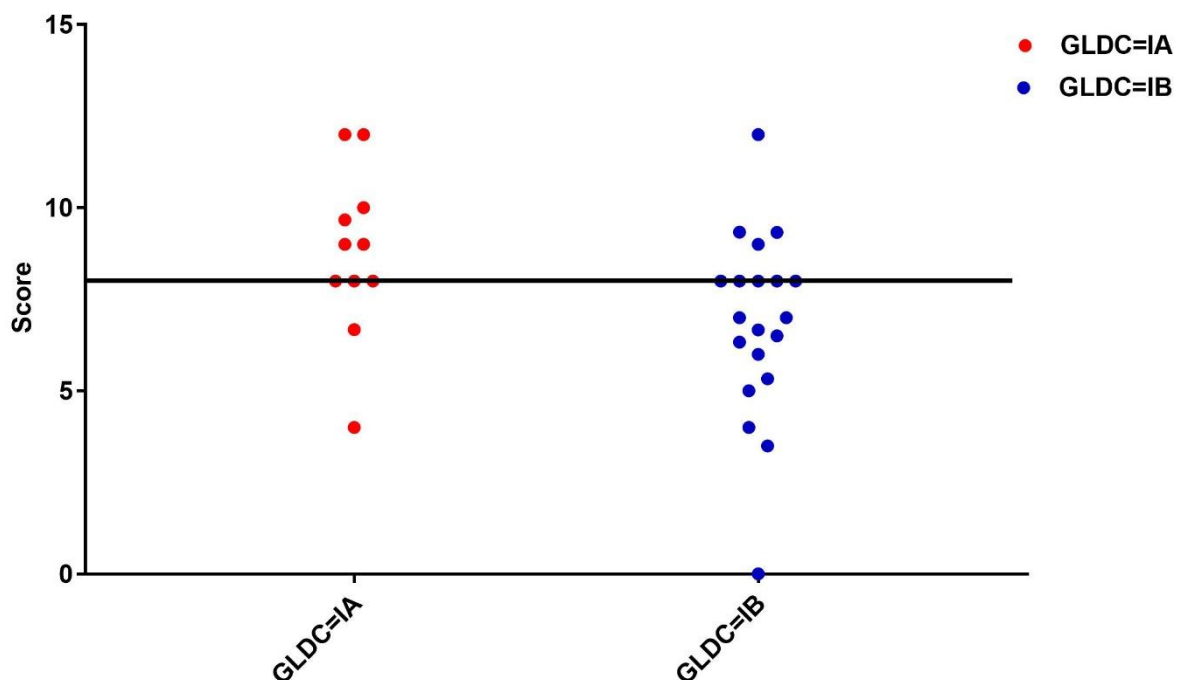


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Verteilung der immunhistochemischen Werte der Kurzzeitüberleber-Gruppe (IA) und Langzeitüberleber-Gruppe (IB) für Anti-CD271. Der horizontale schwarze Balken markiert den Grenzwert für diesen Antikörper.

In der Kurzzeitüberleber-Gruppe betrug der mittlere IHC-Wert für Anti-GLDC 8.76 (7.22- 10.29; KI95%) versus. 6.85 (5.66-8.04; KI 95%) in der Langzeitüberleber-Gruppe. Der hieraus ermittelte p-Wert betrug < 0.05 . Somit stellte sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen ebenfalls als signifikant heraus. Der für diesen Antikörper berechnete Grenzwert betrug ebenfalls 8 (*Abbildung 2*). Für den ermittelten Grenzwert ergab sich ein p-Wert von 0.06. Für Patienten mit einem IHC-Wert > 8 nach Färbung mit einem Antikörper gegen GLDC ergab sich daraus eine 4,2-fach höhere Wahrscheinlichkeit der Kurzzeitüberleber-Gruppe zuzugehören. Dieses Modell ist zu 73,6% valide.



33

Anti-ERRFI1

Für den Antikörper gegen ERRFI1 betrug der mittlere IHC-Wert in der Kurzzeitüberleber-Gruppe 10.57 (9.52-11.61; KI 95%), wohingegen in der Langzeitüberleber-Gruppe der Wert 6.69 (5.56-7.82; KI 95%) betrug. Daraus ergab sich ein p-Wert von <0.001 . Der IHC-Wert für Anti-ERRFI1 kann somit als hochsignifikantes Maß zur Detektion eines Unterschiedes zwischen den beiden Untergruppen herangezogen werden. Der für diesen Antikörper berechnete Grenzwert betrug 9. Für den Grenzwert ergab sich ein p-Wert von 0.01. Daraus ergibt sich für Patienten mit einem IHC-Wert >9 ein 17-fach erhöhtes Risiko der Kurzzeitüberleber-Gruppe zugehörig zu sein. Dieses Modell ist zu 92.1% valide (*Abbildung 3, Abbildung 4*).

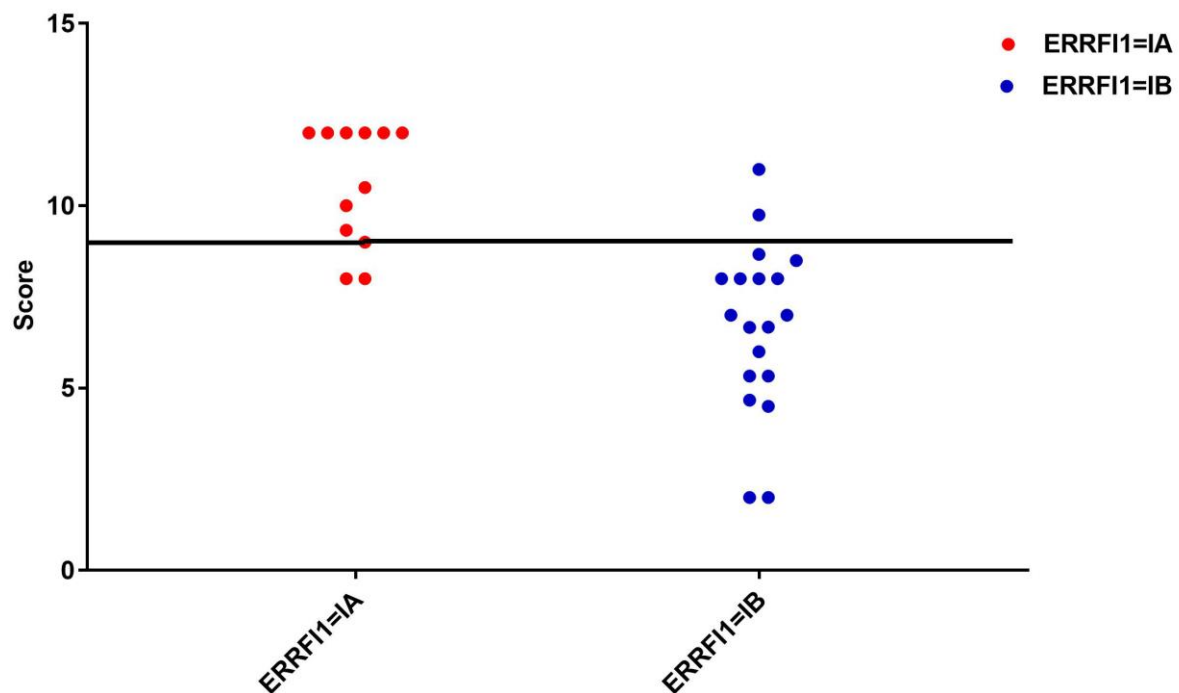


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Verteilung der immunhistochemischen Werte der Kurzzeitüberleber-Gruppe (IA) und Langzeitüberleber-Gruppe (IB) für Anti-ERRFI1. Der horizontale schwarze Balken markiert den Grenzwert für diesen Antikörper.

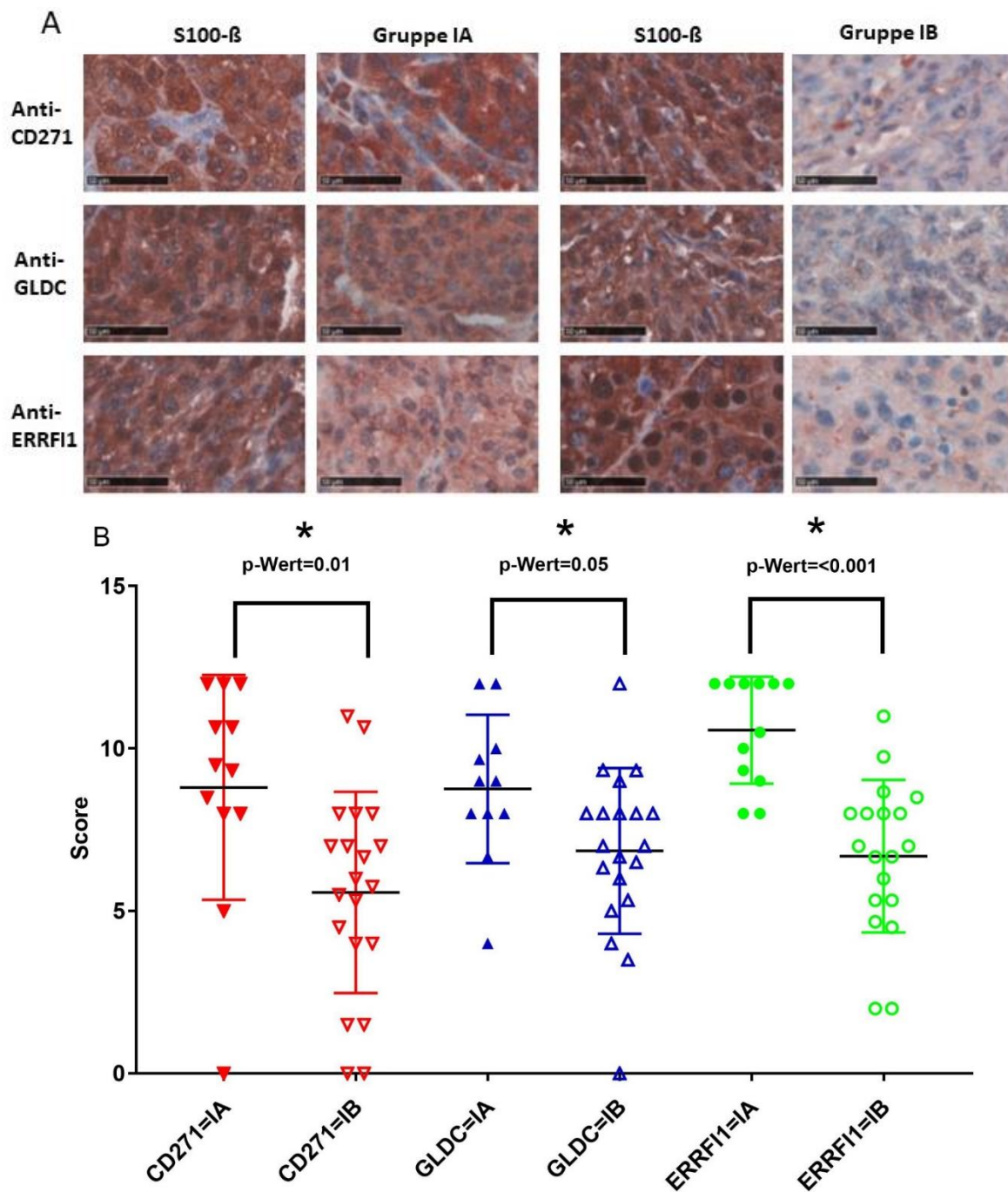


Abbildung 4: Die Neuralleistenzell-Marker CD271, GLDC und ERRFI1 werden vermehrt in fortgeschrittenen Melanomen bei Patienten mit schlechter Prognose exprimiert: A. Immunhistochemische Färbungen von CD271, GLDC und ERRFI1 in der Kurzzeitüberleber-Gruppe (IA) und Langzeitüberleber-Gruppe (IB). Maßstab: 50µm. B. Graphische Darstellung der immunhistochemischen Werte für CD271, GLDC und ERRFI1 für Patienten der Kurzzeitüberleber-Gruppe (IA) und Langzeitüberleber-Gruppe (IB). Die Y-Achse stellt den gesamtimmunhistochemischen Wert (0-12) dar, der sich aus dem Produkt der Quantität und Qualität der Färbung ergibt. Die eingesetzten Antikörper zeigten einen p-Wert <0.05.

Folgende Antikörper zeigten einen höheren mittleren IHC-Wert in der Kurzzeitüberleber-Gruppe im Vergleich zur Langzeitüberleber-Gruppe, was sich allerdings als nicht signifikanter Unterschied herausstellte: Für Anti-TWIST ergab sich ein mittlerer IHC-Wert in der Gruppe der Kurzzeitüberleber von 9.41 (7.30-11.52; KI 95%) und in der Gruppe der Langzeitüberleber von 8.31 (7.17-9.44; KI 95%). Der daraus ermittelte p-Wert betrug 0.29. Für Anti-MSX1 ergab sich in der Kurzzeitüberleber-Gruppe ein mittlerer IHC-Wert von 8.81 (6.61-11.0; KI 95%) versus 7.79 (6.49-9.08; KI 95%) in der Gruppe der Langzeitüberleber. Der daraus berechnete p-Wert lag bei 0.07. Der mittlere IHC-Wert für Anti-Ki67 betrug in der Kurzzeitüberleber-Gruppe 10.14 (5.64-14.64; KI 95%), wohingegen der Wert in der Langzeitüberleber-Gruppe 8.58 (4.92-12.22; KI 95%) betrug. Der ermittelte p-Wert für diesen Antikörper ergab 0.57. In der Gruppe der Kurzzeitüberleber betrug der mittlere IHC-Wert für Anti-PTPRF 7.49 (5.13-9.86; KI 95%), in der Langzeitüberleber-Gruppe 6.19 (4.83-7.55; KI 95%). Der daraus errechnete p-Wert betrug 0.28. Für Anti-TNFRSF21 betrug der mittlere IHC-Wert in der Kurzzeitüberleber-Gruppe 9.03 (6.96-11.09; KI 95%) und in der Gruppe der Langzeitüberleber 8 (6.4-9.6; KI 95%). Der p-Wert für diesen Antikörper in Gruppe I betrug somit 0.41. Der mittlere IHC-Wert in der Kurzzeitüberleber-Gruppe für den Antikörper gegen TNFRSF12 betrug 9.31 (6.92-11.71; KI 95%), wohingegen der Wert in der Langzeitüberleber-Gruppe 8.07 (6.71-9.43; KI 95%) betrug. Daraus ergab sich ein p-Wert von 0.91 (*Abbildung 5, Tabelle 6*).

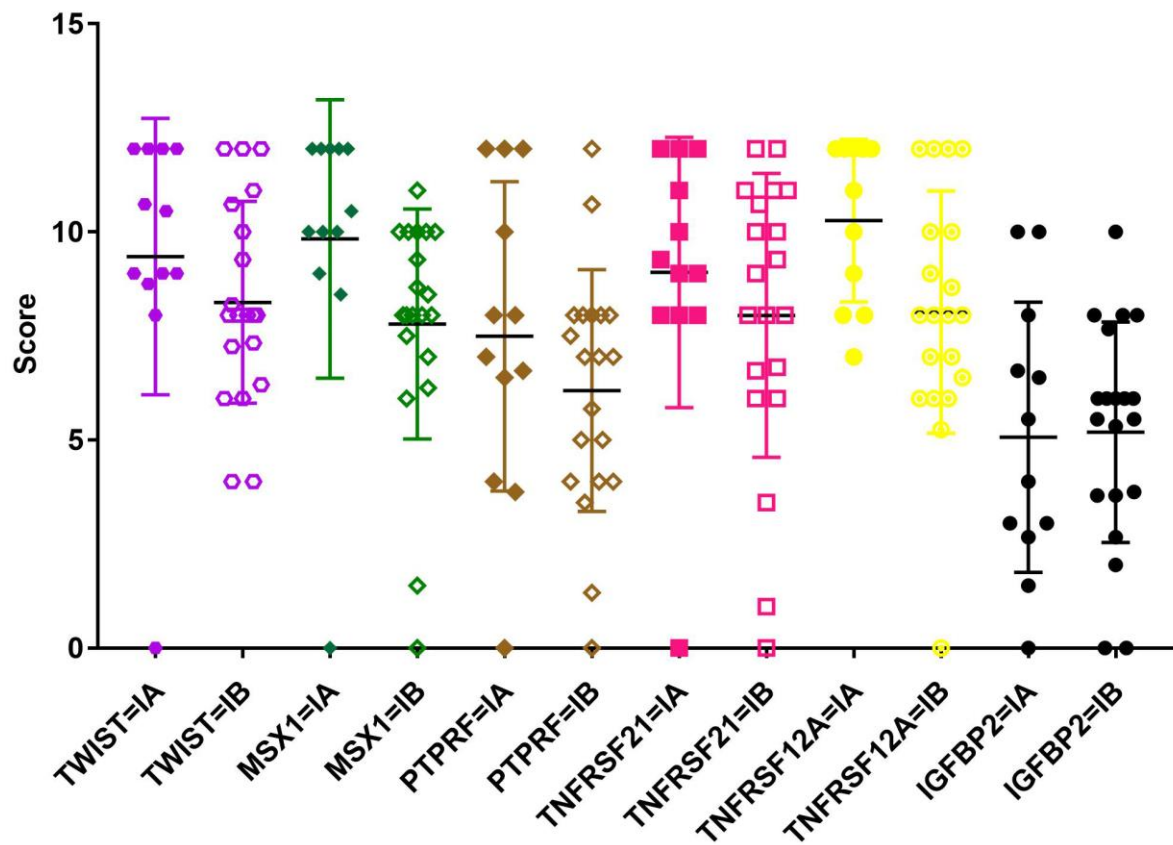


Abbildung 5: Verteilung der immunhistochemischen Werte der nichtsignifikanten Antikörper der Gruppe I (Kurzzeitüberleber-Gruppe (IA) versus Langzeitüberleber-Gruppe (IB)).

Tabelle 6: Ergebnisse des Vergleiches der Kurzzeitüberleber- versus Langzeitüberleber-Gruppe

Antikörper	Kurzzeitüberleber-Gruppe	Langzeitüberleber-Gruppe	P-Wert	Cut off Point	Validität
Anti-CD271	8.81 (6.61-11.0; KI 95%)	5.57 (4.12-7.02; KI 95%)	0.01	8	80%
Anti-GLDC	8.76 (7.22- 10.29; KI95%)	6.85 (5.66-8.04; KI 95%)	0.05	8	73.6%
Anti-ERRFI1	10.57 (9.52-11.61; KI 95%)	6.69 (5.56-7.82; KI 95%)	<0.001	9	92.1%
Anti-TWIST	9.41 (7.30-11.52; KI 95%)	8.31 (7.17-9.44; KI 95%)	0.29	n.b.	n.b.
Anti-MSX1	8.81 (6.61-11.0; KI 95%)	7.79 (6.49-9.08; KI95%)	0.07	n.b.	n.b.
Ki67	10.14 (5.64-14.64)	8.58 (4.92-12.22; KI 95%)	0.57	n.b.	n.b.
Anti-PTPRF	7.49 (5.13-9.86; KI 95%)	6.19 (4.83-7.55; KI 95%)	0.28	n.b.	n.b.
Anti-TNFRSF21	9.03 (6.96-11.09; KI 95%)	8 (6.4-9.6; KI 95%)	0.41	n.b.	n.b.
Anti-TNFRSF12A	9.31 (6.92-11.71; KI 95%)	8.07 (6.71-9.43; KI 95%)	0.3	n.b.	n.b.
Anti-IGFBP2	5.07 (3.01-7.13; KI 95%)	5.19 (3.95-6.43; KI 95%)	0.91	n.b.	n.b.
n.b. = nicht bestimmt					
KI= Konfidenzintervall					

Im Weiteren wurde geprüft, ob eine kombinierte Anwendung von Antikörpern die Aussagekraft hinsichtlich der Prognose erhöhen kann. Mit Hilfe logistischer Regression wurden verschiedene Kombinationsmöglichkeiten geprüft. Es konnten keine signifikanten Kombinationen errechnet werden. Kombinierte man die Antikörper Anti-CD271, Anti-GLDC und Anti-ERRFI1 ergab sich ein p-Wert von 0.34. Auch eine Kombination der Grenzwerte für die oben genannten Antikörper stellte sich mit einem p-Wert von 0.4 als nicht signifikant dar.

5.2. Vergleich Hochrisikogruppe A versus Hochrisikogruppe B

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Patientengruppe mit einem Primarius ≥ 2 mm, die innerhalb von 12 Monaten eine Metastase entwickelte (Hochrisikogruppe A), den Ergebnissen der Patientengruppe mit einem Primarius ≥ 2 mm, die keine Metastase in 30 Monaten entwickelte (Hochrisikogruppe B), gegenübergestellt (*Tabelle 7*). In Gruppe II zeigten sich TWIST und GLDC als signifikante Marker, um ein erhöhtes Risiko für Metastasenentwicklung bei Hochrisiko-Patienten anzuzeigen.

Tabelle 7: Immunhistochemische Werte für jeden Antikörper (Hochrisikogruppe)

Patienten -nummer	Anti- CD271	Anti- GLDC	Anti- ERRF1	Anti- TWIST	Anti- MSX1	Anti- Ki67	Anti- PTPRF	Anti- TNFRSF21	Anti- TNFRSF12A	Anti- IGFBP2
Hochrisikogruppe A: Patienten mit Primärmelanom ≥ 2 mm, die innerhalb von 12 Monaten eine Metastase entwickelten										
33	7.33	7.33	8.00	7.00	9.33	6.00	6.33	10.67	9.00	9.33
34	10.00	12.00	12.00	12.00	8.00	5.00	9.00	10.00	8.00	12.00
35	10.00	12.00	8.00	12.00	12.00	2.00	8.00	10.00	12.00	12.00
36	8.00	12.00	12.00	n.b.	12.00	0.00	4.00	8.00	12.00	12.00
37	5.50	7.00	6.67	6.00	8.00	n.b.	4.00	8.00	12.00	8.00
38	10.00	10.00	8.00	10.00	8.00	1.00	10.00	10.00	12.00	8.00
39	7.00	10.00	12.00	10.00	7.00	2.00	6.00	10.00	12.00	8.00
40	12.00	9.33	9.33	9.33	6.00	13.33	9.33	9.33	8.00	10.00
41	10.00	12.00	8.00	12.00	12.00	n.b.	12.00	12.00	12.00	8.00
42	9.33	6.67	6.67	9.33	7.33	7.00	9.33	9.33	10.67	12.00
43	5.00	8.00	7.33	6.67	7.33	11.67	4.33	5.00	8.00	4.67
44	8.67	12.00	10.00	12.00	12.00	7.00	12.00	12.00	12.00	11.00
45	6.00	8.00	12.00	8.00	12.00	6.50	5.00	10.00	10.00	3.00
46	11.00	12.00	10.67	8.00	12.00	25.00	12.00	12.00	9.33	9.33
47	12.00	8.00	8.00	12.00	8.00	15.00	8.00	12.00	8.00	1.00
48	n.b.	n.b.	9.00	12.00	12.00	0.50	4.00	n.b.	n.b.	4.00
Hochrisikogruppe B: Patienten mit Primärmelanom ≥ 2 mm, die innerhalb von 30 Monaten keine Metastase entwickelten										
49	9.33	8.00	4.67	9.33	10.00	1.00	9.33	10.00	10.00	8.00
50	6.33	3.00	8.00	5.00	6.25	1.33	4.00	5.25	10.00	6.50
51	n.b.	8.00	n.b.	9.00	6.00	30.00	3.00	n.b.	8.00	6.00
52	n.b.	6.00	12.00	8.00	12.00	15.33	8.00	12.00	12.00	0.00
53	6.00	8.00	12.00	10.00	12.00	6.67	6.00	8.00	10.67	9.33
54	n.b.	0.00	0.00	4.00	n.b.	1.00	12.00	8.00	8.00	8.00
55	9.00	10.00	7.00	7.50	6.25	6.25	7.50	8.50	7.00	4.00
n.b. = nicht bestimmt										

Die Tumorproben in der Hochrisikogruppe A für Anti-TWIST ergaben einen mittleren IHC-Wert von 9.76 (8.53-10.97; KI 95%) und in der Hochrisikogruppe B 7.55 (5.46-9.64; KI 95%). Der hieraus ermittelte p-Wert betrug 0.04. Somit stellt sich TWIST als signifikanter Marker heraus. Der errechnete Grenzwert lag bei 12. Da dies der höchstmögliche Wert ist, lässt sich keine Aussage über die Signifikanz in der klinischen Anwendung treffen.

Für Anti-GLDC ergab sich in der Hochrisikogruppe A ein mittlerer IHC-Wert von 9.76 (8.58-10.93; KI 95%) und in der Hochrisikogruppe B von 6.14 (2.92-9.37; KI 95%). Der hieraus ermittelte p-Wert betrug <0.01 . Eine immunhistochemische Färbung von GLDC ermöglichte somit eine hochsignifikante Differenzierung beider Gruppen. Der errechnete Grenzwert betrug 9.33. Der für den Grenzwert ermittelte p-Wert betrug 0.05. Patienten mit einem IHC-Wert >9.33 für den Antikörper gegen GLDC haben somit ein 5.7-faches Risiko der Hochrisikogruppe A zugehörig zu sein und somit früher eine Metastase zu entwickeln. Dieses Modell ist zu 79,5% valide (*Abbildung 6*).

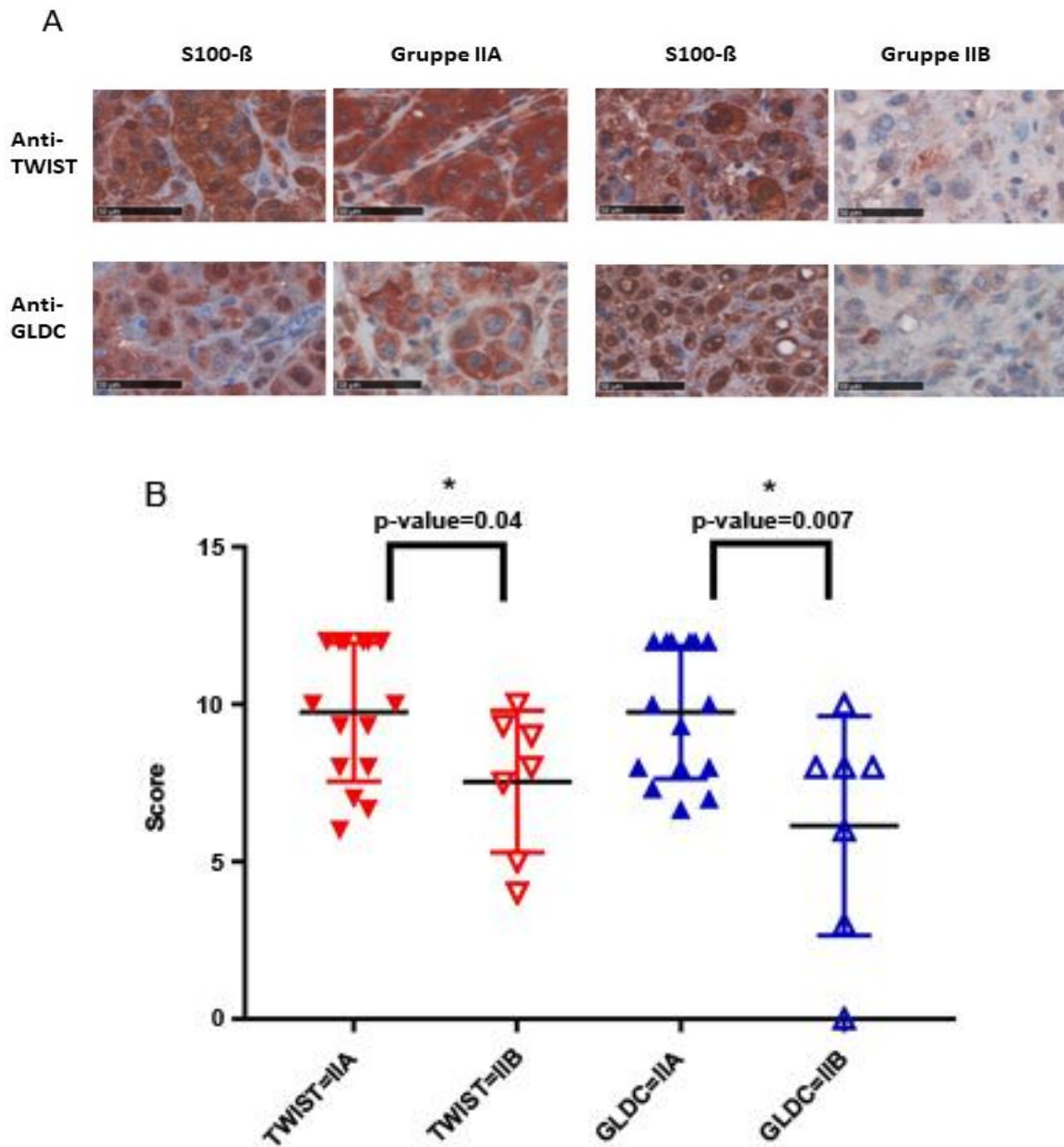


Abbildung 6: Die Neuralleistenzell-Marker TWIST und GLDC werden vermehrt in Primären exprimiert, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einhergehen, früh zu metastasieren: A. Immunhistochemische Färbungen von TWIST und GLDC in der Hochrisikogruppe A (IIA) und Hochrisikogruppe B (IIB). Maßstab: 50µm. B. Graphische Darstellung der immunhistochemischen Werte für TWIST und GLDC für Patienten der Hochrisikogruppe A und Hochrisikogruppe B. Die Y-Achse stellt den gesamtimmunhistochemischen Wert (0-12) dar, der sich aus dem Produkt der Quantität und Qualität der Färbung ergibt. Die eingesetzten Antikörper zeigten einen p-Wert <0.05.

Folgende Antikörper zeigten einen höheren mittleren IHC-Wert in der Hochrisikogruppe A im Vergleich zur Hochrisikogruppe B, was sich allerdings als nicht signifikanter Unterschied herausstellte: Der mittlere IHC-Wert in der Hochrisikogruppe A für Anti-MSX1 betrug 9.56 (8.33-10.8; KI 95%), wohingegen dieser in der Hochrisikogruppe B 8.75 (5.68-11.82; KI 95%) betrug. Daraus ergab sich ein p-Wert von 0.5. Der für den Antikörper gegen CD271 ermittelte mittlere IHC-Wert betrug in der Hochrisikogruppe A 8.79 (7.55-10.03; KI 95%), in der Hochrisikogruppe B 7.67 (4.9-10.44; KI 95%). Der errechnete p-Wert betrug 0.37. In der Hochrisikogruppe A ergab sich für Anti-ERRFI1 ein mittlerer IHC-Wert von 9.23 (8.18-10.27; KI 95%), in der Hochrisikogruppe B betrug dieser 7.28 (2.47- 12.09; KI 95%). Daraus ergab sich ein p-Wert von 0.35. Für den Antikörper Anti-Ki67 ergab sich in der Hochrisikogruppe A ein mittlerer IHC-Wert von 7.47 und in der Hochrisikogruppe B betrug dieser 8.80, u-Wert = 1. In der Hochrisikogruppe A ergab sich für Anti-PTPRF ein mittlerer IHC-Wert von 7.71 (6.13-9.3; KI 95%), wohingegen dieser in der Hochrisikogruppe B 7.12 (4.25-9.98; KI 95%) betrug. Daraus errechnete sich ein p-Wert von 0.67. Der mittlere IHC-Wert in der Hochrisikogruppe A für Anti-TNFRSF21 betrug 9.89 (8.84-10.94; KI 95%), der in der Hochrisikogruppe B 8.63 (6.26-10.99; KI 95%). Daraus ergab sich ein p-Wert von 0.21. In der Hochrisikogruppe A betrug der mittlere IHC-Wert für Anti-TNFRSF12a 10.33 (9.35-11.32; KI 95%) und in der Hochrisikogruppe B 9.38 (7.75-11.02; KI 95%), p-Wert = 0.25. Der mittlere IHC-Wert für Anti-IGFBP2 betrug in der Hochrisikogruppe A 13.53 und in der Hochrisikogruppe B 8.5. Der daraus errechnete u-Wert betrug 0.1 (*Abbildung 7, Tabelle 8*).

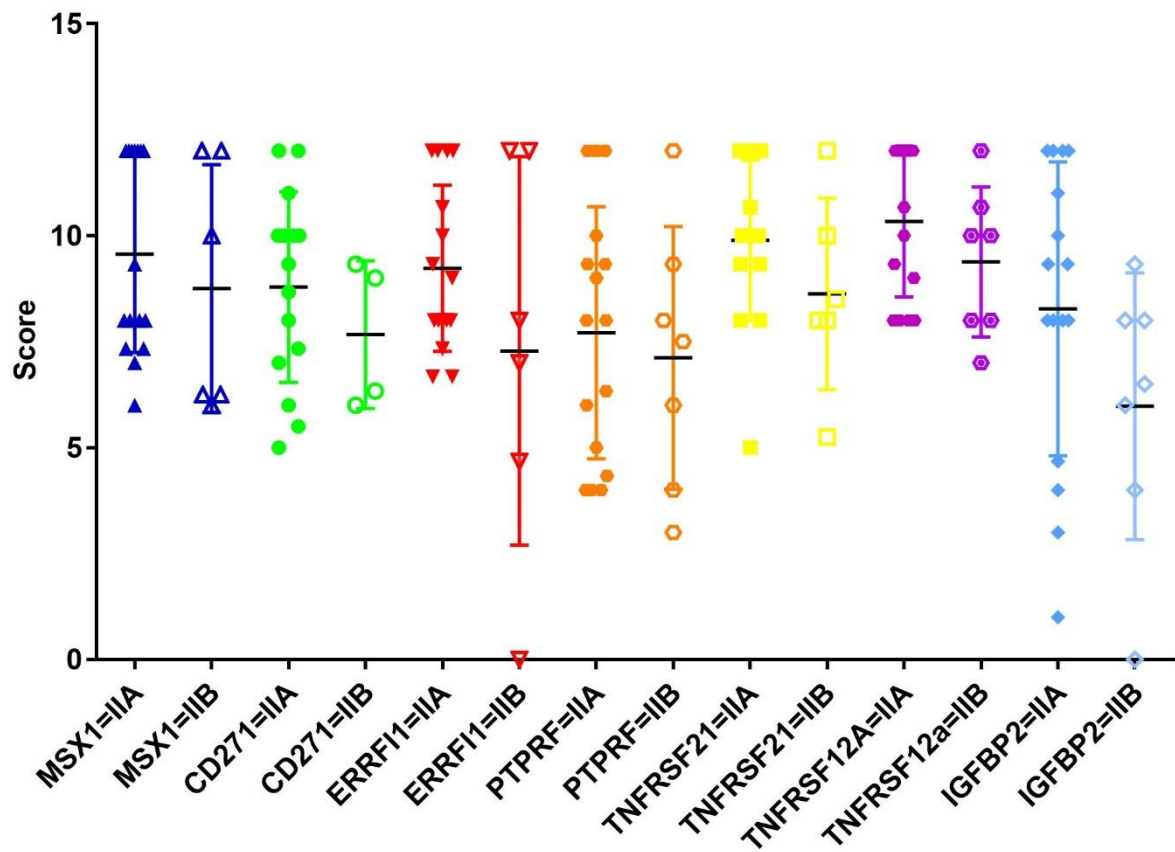


Abbildung 7: Verteilung der immunhistochemischen Werte der nicht signifikanten Antikörper der Gruppe II (Hochrisikogruppe A (IIA) und Hochrisikogruppe B (IIB)).

***Tabelle 8:** Ergebnisse des Vergleiches der Hochrisikogruppe A versus Hochrisikogruppe B*

Antikörper	Hochrisikogruppe A	Hochrisikogruppe B	P-Wert	Cut off Point	Validität
Anti-TWIST	9.76 (8.53-10.97; KI 95%)	7.55 (5.46-9.64; KI 95%)	0.04	12	75.2%
Anti-GLDC	9.76 (8.58-10.93; KI 95%)	6.14 (2.92-9.37; KI 95%)	0.007	9.33	62%
Anti-MSX1	9.56 (8.33-10.8; KI 95%)	8.75 (5.68-11.82; KI 95%)	0.5	n.b.	n.b.
Anti-CD271	8.79 (7.55-10.03; KI 95%)	7.67 (4.9-10.44; KI 95%)	0.37	n.b.	n.b.
Anti-ERRFI1	9.23 (8.18-10.27; KI 95%)	7.28 (2.47- 12.09; KI 95%)	0.35	n.b.	n.b.
Ki67	7.47	8.80	u-Wert=1	n.b.	n.b.
Anti-PTPRF	7.71 (6.13-9.3; KI 95%)	7.12 (4.25-9.98; KI 95%)	0.67	n.b.	n.b.
Anti-TNFRSF21	9.89 (8.84-10.94; KI 95%)	8.63 (6.26-10.99; KI 95%)	0.21	n.b.	n.b.
Anti-TNFRSF12A	10.33 (9.35-11.32; KI 95%)	9.38 (7.75-11.02; KI 95%)	0.25	n.b.	n.b.
Anti-IGFBP2	13.53	8.5	u-Wert=0.1	n.b.	n.b.
n.b. = nicht bestimmt					
KI= Konfidenzintervall					

6. Diskussion

6.1 NGFR-Gen (CD271)

Das NGFR-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und codiert für das CD271-Antigen, auch bekannt als Nerve-Growth-Factor-Rezeptor. Es gehört zur TNF (Tumornekrosefaktor) Rezeptor Superfamilie. Es handelt sich um ein transmembranöses Protein, welches zu den Neuralleistenmarkern zählt. Die Expression des Proteins wurde in Geweben nachgewiesen, die von Neuralleistenzellen abstammen. Dazu zählen auch das maligne Melanom sowie verschiedene weitere Tumoren (Chesa et al. 1988). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine erhöhte Proteinexpression bei Patienten im Stadium IV mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Patienten mit einem immunhistochemischen (IHC) Wert >8 für Anti-CD271 haben ein erhöhtes Risiko früher zu sterben, als Patienten im Stadium IV mit einem niedrigeren Wert.

Der Rezeptor beteiligt sich an drei verschiedenen Rezeptor-Plattformen, die je nach Ligandenbindung und Umständen entweder das Überleben der Zelle ermöglichen, deren Wachstum inhibieren oder zu ihrem Tod führen (Barker 2004). Neben der Beeinflussung von Differenzierungsprozessen zum Beispiel von Keratinozyten (Truzzi et al. 2015), gilt CD271 als essentiell für die Tumorentstehung und -differenzierung. Zhou et al. fanden heraus, dass CD271 in manchen Tumoren die Aktivität des Tumorsuppressors p53 hemmen und durch diesen Mechanismus zur Tumorentstehung beitragen kann (Zhou et al. 2016). Des Weiteren wurde die Expression von CD271 in Krebsstammzellen nachgewiesen, die die Tumorentstehung initiieren (Boiko et al. 2010). Eine Überexpression von CD271 in Tumorzellen fördert die Migration und Invasion und verleiht diesen dadurch stammzellähnliche Eigenschaften. Man geht davon aus, dass der Rezeptor dadurch neben der Tumorentstehung auch maßgeblich an Metastasierungsprozessen beteiligt ist (Boiko et al. 2010). Allerdings ist die Funktion des Proteins nicht abschließend geklärt. Es konnte hingegen auch gezeigt werden, dass CD271 Apoptose induziert und Metastasierungsprozesse verhindert (Molloy, Read, and Gorman 2011). So wird vermutet, dass CD271 eine suppressive Wirkung in Prostata- und Harnblasenkarzinomen hat (Krygiel and Djakiew 2002; Tabassum, Khwaja, and Djakiew 2003).

6.2 GLDC-Gene

Die GLDC-Gene sind auf Chromosom 9 lokalisiert. Das Genprodukt ist das Enzym Glycin-Decarboxylase, welches als Teil eines mitochondrialen Proteinkomplexes an der Synthese von Serin durch die Decarboxylierung von Glycin beteiligt ist (Go et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass der Metabolismus von Glycin im Zusammenhang mit der Proliferationsrate von Tumorzellen steht. Dies wurde besonders deutlich in Melanomzellen sowie Ovarial- und Kolonkarzinomen gezeigt (Jain et al. 2012). Der Einfluss einer Überexpression des GLDC-Gens auf das Fortschreiten des Krankheitsprozesses konnte in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden, indem gezeigt wurde, dass ein erhöhter IHC-Wert von >9.33 bei Hochrisikomelanomen für den GLDC-Antikörper mit einem 5.7-fach erhöhten Risiko einhergeht, früher im Krankheitsprozess zu metastasieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein IHC-Wert >8 bei Patienten im Stadium IV mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens einhergeht. Ähnliche Ergebnisse konnten in Zellen von Lungentumoren gezeigt werden. Die gesteigerte Aktivierung von GLDC durch die Onkogene Ras, PI3K und Myc führte hier zu einer erhöhten Proliferation und Zellumwandlung. Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass GLDC ein metabolisches Onkogen ist, welches notwendig für die Entstehung eines Tumors und wichtig für dessen Proliferation ist (W. C. Zhang et al. 2012).

6.3 ERRF1-Gen

Das ERRF1-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Es wird auch mitogen-inducible gene-6 (Mig-6) genannt. Die Genexpression kann sowohl unter physiologischen, als auch pathologischen Umständen durch Faktoren wie Hormone, Wachstums- und Stressfaktoren induziert werden. Auf diese Reize reagiert die Zelle sofort, schnell und stark, indem sie die ERRF1-Expression hochreguliert, was darauf hindeutet, dass ERRF1 eine wichtige Rolle bei frühen zellulären Stressantworten spielt. Die Induktion der Genexpression erfolgt über den Ras-MEK-ERK-Signalweg (Y.-W. Zhang and Vande Woude 2007). Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein cytoplasmatisches Adapterprotein mit tumorsuppressor-ähnlicher Wirkung, dessen Expression bei Zellwachstum hochreguliert wird (Wick et al. 1995). Es gilt als molekulare Bremse, indem es den Epidermal-growth-factor-Signalweg durch direkte Interaktion mit dem EGF-Rezeptor (auch bekannt als ErbB1) herunterreguliert (Chen et al. 2013; Y.-W.

Zhang and Vande Woude 2007). Darüber hinaus interagiert und inhibiert ERRFI1 alle vier ErbB-Familienmitglieder (Hackel, Gishizky, and Ullrich 2001; Fiorentino et al. 2000; Jiang et al. 2016). ErbB-Familienmitglieder fördern Zellüberleben, -proliferation, -migration und -invasion (Baselga and Swain 2009). Dies steht im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit, da eine vermehrte Expression des ERRFI1-Gens laut den oben beschriebenen Erkenntnissen einen tumorhemmenden Effekt erwarten lassen würden. In der vorliegenden Arbeit hatten Patienten mit einem IHC-Wert >9 ein 17-fach erhöhtes Risiko früher zu sterben und somit eine schlechtere Prognose, als Patienten mit einem niedrigeren IHC Wert. Somit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression des ERRFI1-Gens und einer schlechten Prognose gezeigt werden. Neue Erkenntnisse lassen allerdings vermuten, dass die Rolle von ERRFI1 vom EGFR-Level abhängt. So konnte in Melanomzellen gezeigt werden, dass ERRFI1 Migrations- und Invasionsprozesse negativ beeinflusst bzw. die Herunterregulierung von ERRFI1 in einem EGF-reichen Umfeld migrationsfördernde Eigenschaften mit sich bringt (Vu et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden die EGF-Levels nicht bestimmt, so dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Validität von ERRFI1 als prognostischem Marker in verschiedenen Subtypen des malignen Melanoms zu bestimmen.

6.4 TWIST-Gen

Das TWIST-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert und codiert für einen basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor. Eine Mutation dieses Gens ist mit dem autosomal-dominanten Saethre-Chotzen-Syndrom assoziiert. Dabei handelt es sich um eine seltene kraniofaziale Fehlbildung (Howard et al. 1997). Wie auch CD271 ist TWIST als Neuralleistenmarker bekannt (Clewes et al. 2011). Der Transkriptionsfaktor TWIST ist an der Determination während der Morphogenese und Proliferation von Zellen beteiligt. Er gehört zu den EMT-Markern. Bei EMT handelt es sich um einen Prozess, bei dem epitheliale Zellen bestimmte Charakteristika wie Zellpolarität aufgeben und so einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, was ihnen die Migration ermöglicht (Papadaki et al. 2014; Yang et al. 2004). Eine Funktion von TWIST bei diesem Prozess besteht darin, die Zelladhärenzen zu reduzieren, indem die Expression von E-Cadherinen unterdrückt wird. Neben der Herunterregulierung von E-Cadherinen im Rahmen des EMT-Prozesses kommt es zu einer Hochregulierung der Expression von N-Cadherinen. Diese sind wichtig für die Regulierung von Zellwanderung, -invasion

und –überleben (Gheldof and Berx 2013). Dieser Mechanismus findet allerdings nicht nur in gesunden, sondern auch in Tumorzellen statt. Die Überexpression des TWIST-Gens oder dessen Methylierung wird häufig in metastasierten Tumorleiden wie Karzinomen, Sarkomen und Lymphomen gefunden (Khan et al. 2013). Die Tumorzellen nutzen den oben beschriebenen Mechanismus, um interzelluläre Verbindungen zu lösen und geben somit Tumorzellen die Möglichkeit, vom Primarius abzuwandern (Onder et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion des Transkriptionsfaktors TWIST eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumoren spielt, jedoch keinen Effekt auf das Tumorwachstum des Primarius hat (Yang et al. 2004; Tang et al. 2016). Des Weiteren induziert TWIST die Expression von forkhead box protein C2 (FOXC2), einem Transkriptionsfaktor, der mit der Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen in Verbindung gebracht wird (Mani et al. 2007). Das Y-Box binding protein (YB-1) ist an der Tumorprogression, Invasion und Therapieresistenzen beteiligt und wird ebenfalls von TWIST induziert (Shiota et al. 2011). Angiogenese stellt eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung dar. Diese wird ebenfalls durch eine Überexpression von TWIST begünstigt (Mironchik et al. 2005). Zudem hat TWIST Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, was die Migration in und aus Blutgefäßen fördert, eine weitere Bedingung für Metastasierungsprozesse (Stoletov et al. 2010). Passend zu den oben beschriebenen Erkenntnissen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Patienten mit einem Primarius der Tumordicke ≥ 2 mm und einer vermehrten TWIST-Expression ein signifikant erhöhtes Risiko haben, früher zu metastasieren, als Patienten mit einem niedrigeren Wert. Der errechnete Grenzwert für diesen Antikörper betrug in der vorliegenden Arbeit 12. Da dies der höchst mögliche Wert ist, sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Grenzwert zu spezifizieren und ihn somit als klinisches Werkzeug einsetzbar zu machen. Vergleicht man die Gruppen der Kurz- und Langzeitüberleber hinsichtlich der TWIST-Expression, kann ein Unterschied erkannt werden, der allerdings nicht signifikant ist ($p=0.29$). Das könnte daran liegen, dass das untersuchte Tumorgewebe von Patienten stammt, die bereits metastasiert waren. Weitere Investigationen sind notwendig, um eine mögliche ansteigende TWIST-Expression während der Tumorprogression zu detektieren.

6.5 MSX1-Gen

Das MSX1-Gen ist auf Chromosom 4 lokalisiert. Es handelt sich um ein sogenanntes homöotisches Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der verschiedene Entwicklungsprozesse reguliert. Diese Transkriptionsfaktoren haben Einfluss auf Zellwachstum, intrazelluläre Kommunikation sowie den Apoptosevorgang während der Embryonalentwicklung (Bendall and Abate-Shen 2000). MSX 1 ist ein inhibierender Transkriptionsfaktor. Er spielt eine Rolle bei der Determinierung von Neuralleistenzellen und ist an der EMT beteiligt und somit auch an der Entwicklung von Melanozyten (Gouti, Briscoe, and Gavalas 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Produkte homöotischer Gene als Tumormodulatoren fungieren (Cillo et al. 2001; Abate-Shen 2002). So konnte demonstriert werden, dass MSX1 in Melanomzellen reaktiviert wird und diesen Vorläufer-ähnliche Eigenschaften verleiht wie zum Beispiel Plastizität und Migrationsfähigkeit. Experimentell bewirkt die ektope Expression von MSX1 sowohl in Melanozyten, als auch in Melanomzellen eine Pigmentabnahme sowie eine verminderte Expression von melanozytären Markern, während sie auf der anderen Seite Charakteristika ihrer Vorläufer, der Neuralleistenzellen, annehmen. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MSX1 und der Tumorprogression. Es ist maßgeblich an der Metastasierung beteiligt. Hierbei reguliert MSX1 wichtige Proteine wie E-Cadherine und Transkriptionsfaktoren wie M-MITF und ZEB1 (Heppt et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der MSX1-Expression und der Überlebenszeit gezeigt werden, der allerdings nicht signifikant war ($p=0.07$). Die IHC-Werte der Gruppen implementieren eine zunehmende Expression während der Tumorprogression. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Vermutung zu validieren.

6.6 MKI67-Gen

Das MKI67-Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert. Die Expression ist eng mit dem Zellzyklus verknüpft. Während der G0- und frühen G1-Phase wird es gar nicht exprimiert, während die Expression in der S-Phase am höchsten ist. Während der Ana- und Telophase nimmt diese wieder ab (Gerdes et al. 1984; Starborg et al. 1996). Die Funktion des Proteins Ki67 ist noch nicht endgültig geklärt. Das Protein ist an der Zusammenführung des perichromosomalen Kompartiments während der Mitose beteiligt. Zellen, in denen Ki67 experimentell herunterreguliert wurde, haben einen

verkleinerten Zellkern. Zwar können die Zellen in den nächsten Zellzyklus übergehen, aber es kommt zu Problemen in der zweiten Mitose-Teilung verbunden mit einer höheren Apoptoserate (Booth et al. 2014). Somit kann das Genprodukt Ki67 als Proliferationsmarker für sich teilende Zellen, sowohl in gesundem, als auch in Tumorgewebe eingesetzt werden (Gerdes et al. 1991). In ruhenden Zellen ist das Protein hingegen nicht zu finden (Gerdes et al. 1983). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ki67 in die -Synthese ribosomaler RNA involviert ist (Bullwinkel et al. 2006). Während der Mitose soll das Protein zudem an der Stabilisierung der Mitosespindel beteiligt sein (Vanneste et al. 2009). Aufgrund seiner Funktion als Proliferationsmarker wird Ki67 als prädiktiver und prognostischer Marker in Tumorgeweben, zum Beispiel beim Mammakarzinom, eingesetzt (Jurikova et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Ki67-Expression hinsichtlich Prognose und Metastasierungszeitpunkt beim malignen Melanom gezeigt werden.

6.7 PTPRF-Gen

Das PTPRF-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert und codiert für den Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ F, der den EGFR-Signalweg reguliert. Während PTPRF in gesunden Melanozyten nicht oder nur wenig exprimiert wird, so ist es in Tumorzellen, sowohl in Primarien, als auch in Metastasen, stark exprimiert (W. Liu, Peng, and Tobin 2013). Die Tatsache, dass das Protein sowohl in Primarien, als auch in Metastasen vermehrt exprimiert wird, lässt darauf schließen, dass keine relevante Zunahme der Expression während der Tumorprogression stattfindet. In hepatozellulären Karzinomen ist die Expression von PTPRF herunterreguliert. Somit wird die Wachstumshemmung, die einer Hyperproliferation und Tumorentstehung entgegen wirken soll, geschwächt (Bera et al. 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens weniger in Zusammenhang mit dem Zellzyklus steht, sondern durch Zell-Zell-Kontakte während der Zellproliferation induziert wird. Die Suppression der Zellproliferation erfolgt über eine negative Regulierung von ERK1/ERK2-MYC sowie der Hemmung der Signalwege von Insulin-Rezeptoren. Neben der Herunterregulierung im hepatozellulären Karzinom konnte diese darüber hinaus noch in Magen-, Kolon- und Mammakarzinomen festgestellt werden (Bera et al. 2014; Du et al. 2013). Diese Erkenntnisse implizieren, dass PTPRF als Tumorsuppressor fungiert, der in Leber-, Magen- und Kolonkarzinomen

herunterreguliert ist (Bera et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in Expression zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden und somit keine Prognose hinsichtlich Überlebenszeit oder Metastasierungsrisiko getroffen werden.

6.8 TNFRSF12A-Gen

Das TNFRSF12A-Gen ist auf Chromosom 16 und 17 lokalisiert. Als Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie ist das Genprodukt am pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induzierten Signalweg und der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Signalkaskade beteiligt. Bei der TNF-Rezeptor-Superfamilie handelt es sich um transmembrane Rezeptoren, an die der Tumornekrosefaktor bindet. Der TNFRSF12A-Rezeptor wird auch als TweakR bezeichnet. Die Aktivierung des Rezeptors durch das Zytokin TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) führt zu einer Induktion von Genexpression, was Auswirkung auf Gewebsreparaturmechanismen, Angiogenese und Zellmigration hat, zum anderen spielt es eine Rolle beim Zelltod und ist maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt (Cabal-Hierro and Lazo 2012; Jakubowski et al. 2002; Girgenrath et al. 2006; Tran et al. 2006). So reguliert der Rezeptor beispielsweise Signalwege, die maßgeblich an der Reparatur nach Gewebsverletzungen beteiligt sind (Winkles 2008). Neben der normalen physiologischen Funktion kommt dem Rezeptor eine Rolle in Tumoren zu, wo er den nuclear factor-kappaB-Signalweg aktiviert, welcher eine wichtige Rolle in immunologischen und entzündlichen Prozessen sowie bei der Tumorentstehung und der Tumortherapieresistenz spielt (Winkles, Tran, and Berens 2006). In bestimmten Tumorzelllinien induziert die Bindung des Liganden an den TNFRSF12-Rezeptor den Zelltod (Nakayama et al. 2002). Doch dieser Mechanismus ist nicht in allen Tumorzelllinien ausgeprägt. So ist der Rezeptor beispielsweise in allen invasiven Subtypen des Mammakarzinoms überexprimiert und führt in diesen aber nicht zum Zelltod, sondern dosisabhängig zur Hemmung des Tumorwachstums (Chao et al. 2013). In dieser Arbeit zeigte sich der Nachweis der Genexpression von TNFRSF12A als nicht geeignet, um eine Aussage hinsichtlich Überlebenszeit oder Metastasierungsrisiko zu treffen.

6.9 TNFRSF21-Gen

Das TNFRSF21-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert. Es codiert ebenfalls für ein Mitglied der TNF-bindenden Rezeptorfamilie. Der durch das Gen codierte Rezeptor gehört zu der 'death receptor'-Untergruppe und wird auch death receptor 6 (DR6) genannt. Es handelt sich dabei um einen transmembranen Rezeptor, der in den meisten Geweben exprimiert ist, besonders reichlich aber im Herzen, im Gehirn, in der Placenta, im Pankreas und in den lymphatischen Organen. Tierexperimente ergaben, dass DR6 keine Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt. Stattdessen ist der Rezeptor an der Regulierung der T-Zell-Aktivität beteiligt sowie an der Differenzierung von T-Helferzellen. Darüber hinaus beeinflusst DR6 die Expansion von B-Zellen und die humorale Immunantwort. Er gilt als negativer Regulator der Immunantwort (Schmidt et al. 2003). Durch die Rezeptoraktivierung oder dessen autonome Signaltransduktion kommt es zur Apoptose und zur Aktivierung von NF-kappaB, das wie oben bereits beschrieben eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielt (Pan et al. 1998; Winkles, Tran, and Berens 2006). In den meisten Tumorzelllinien aus Lungen- und kolorektalen Karzinomen wurden moderate Expressionsraten gefunden. Im Vergleich zu diesen zeigte sich eine erhöhte Expressionsrate in verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien. Etwas niedrigere Raten wurden in Mammakarzinomen gefunden (Kasof et al. 2001). Der Ligand ist unbekannt (Benschop, Wei, and Na 2009). Sowohl für TNFRSF21, als auch für TNFRSF12A konnte ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen gezeigt werden, der allerdings nicht signifikant war.

6.10 IGFBP2-Gen

Das IGFBP2-Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert. IGFBP2 gehört zur Superfamilie der Insulin-like growth factor binding proteins, von denen sieben Subtypen bis jetzt identifiziert werden konnten (Shin et al. 2017). Das Protein hat sowohl intrazelluläre, als auch extrazelluläre Funktionen. Es bindet Transmembranproteine (Integrine) und aktiviert PI3K/AKT, NF-kappaB und ERK (Holmes et al. 2012; G. K. Wang et al. 2006). Es wird hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert, findet sich darüber hinaus aber auch in adultem Gewebe. Expressionsanalysen ergaben, dass IGFBP2 hauptsächlich in Leber-, Nieren- und Prostatagewebe exprimiert wird. IGFBP2 ist an metabolischen Signalwegen beteiligt. So wird angenommen, dass die IGFBP2 sehr wichtig für die Modifikation von Insulin und die Sensitivität des Insulin-Like Growth

Factor (IGF) 1 ist. Das codierte Protein bindet IGF 1 und 2 und moduliert dadurch deren Aktivität. Neben der normalen physiologischen Wirkung ist IGFBP2 an der Entstehung von metabolischen Erkrankungen beteiligt (Shin et al. 2017). Darüber hinaus spielt das Protein unabhängig von IGFs eine Rolle bei der Proliferation, Apoptose und Migration von Zellen während der Embryogenese und in Tumorzellen (Yao et al. 2016; Fukushima and Kataoka 2007). Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorarten (Gliomen, Prostata-, Brust und Lungenkarzinomen) eine Reaktivierung von IGFBP2 stattfindet (Mehrian-Shai et al. 2007; Fuller et al. 1999; Busund et al. 2005; Yazawa et al. 2009). In high-grade Gliomen ist IGFBP2 an der Tumorentstehung und -progression beteiligt (Dunlap et al. 2007). Obwohl die Rolle von IGFBP2 an der Entstehung von Tumoren bekannt ist, sind die genauen Mechanismen noch unklar. Es findet eine dosisabhängige Regulierung von IGFBP2 durch p53 statt, was indiziert, dass IGFBP2 ein Ziel des Tumorsuppressors ist (Grimberg et al. 2006). Weitere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass IGFBP2 darüber hinaus an Erkrankungen wie MEN1 und der Muskeldystrophie Typ Duchenne beteiligt ist (Shin et al. 2017). Die ermittelten immunhistochemischen Werte für Anti-IGFBP2 haben zwischen den hier untersuchten Gruppen keinen signifikanten Unterschied ergeben.

6.11 Klinische und laborchemische Parameter

Die Auswahl der Patienten für die vorliegende Arbeit erfolgte anhand klinischer Daten. Hauptauswahlkriterium war in der ersten Gruppe, wie lange die Patienten nach der Diagnostizierung von Stadium IV überlebten. Patienten im Stadium IV, die innerhalb von 12 Monaten verstarben wurden in der Kurzzeitüberleber-Gruppe zusammengefasst und in der Vergleichsgruppe (Langzeitüberleber-Gruppe) wurden Patienten im Stadium IV zusammengefasst, die über 30 Monate überleben. Die Geschlechterverteilung in den untersuchten Patientengruppen entsprach nicht der üblichen Verteilung (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe 2016). Dies kann daran liegen, dass die Gruppen nicht als Querschnitt, sondern anhand der Überlebenszeit und des Risikos zur Metastasierung (Tumordicke ≥ 2 mm), gebildet wurden. Epidemiologische Zahlen belegen, dass bei Männern vermehrt ungünstige Eigenschaften des Primarius, wie zum Beispiel Ulzeration und eine größere Tumordicke auftreten und somit ein erhöhtes Risiko für eine verkürzte Gesamtüberlebenszeit sowie ein erhöhtes Metastasierungsrisiko gegenüber Frauen besteht (Lasithiotakis et al. 2008; Scoggins et al. 2006). Diese Erkenntnis spiegelt sich

auch in den Zahlen der vorliegenden Arbeit wider. Von den 54 untersuchten Patienten waren 38.89% weiblich und 61.11% männlich. In der Kurzzeitüberleber-Gruppe waren 33.33% weiblich und 66.67% männlich. In der Langzeitüberleber-Gruppe hingegen waren 55% weiblich und 45% männlich. In der Hochrisikogruppe A waren lediglich 25% weiblich und 75% männlich. In der Hochrisikogruppe B waren 71.43% weiblich und 28.37% männlich.

In der Kurzzeitüberleber-Gruppe betrug die durchschnittliche Tumordicke 2.8 mm verglichen mit 3.3 mm in der Langzeitüberleber-Gruppe. Geht man davon aus, dass die Kurzzeitüberleber-Gruppe aufgrund der kürzeren Überlebenszeit nach Eintritt in Stadium IV eine schlechtere Prognose gegenüber der Langzeitüberleber-Gruppe aufweist, wäre ein höherer Wert hinsichtlich der Tumordicke nach Breslow in der Kurzzeitüberleber-Gruppe zu erwarten. Dies war in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall. Wie oben bereits beschrieben, steigt mit zunehmender Tumordicke das Metastasierungsrisiko (Balch et al. 2009). Die vorliegenden Zahlen unterstützen diese Erkenntnis, da sowohl in der Kurzzeitüberleber-Gruppe, als auch in der Langzeitüberleber-Gruppe die Tumordicke nach Breslow insgesamt hoch war. Darüber hinaus lassen diese Ergebnisse aber keine weitere Aussage über die Prognose bezüglich der beiden Untergruppen (Kurzzeitüberleber- und Langzeitüberleber-Gruppe) zu. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass ein Bias vorliegt, da in Gruppe I nur bereits metastasierte Patienten eingeschlossen wurden.

Ein Kriterium für die Auswahl der Patienten für Gruppe II war die Tumordicke nach Breslow, so dass auch hier ein Selektionsbias herrscht. In Hochrisiko-Gruppe A betrug die durchschnittliche Tumordicke 5 mm und in Hochrisiko-Gruppe B 2.5 mm. Hier verdeutlichen die Zahlen die Korrelation zwischen einer erhöhten Tumordicke und einer frühen Metastasierung.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Primarien im ulzerierten Stadium mit einer verringerten Progressions-freien Zeit und einem verringerten Gesamtüberleben einhergehen (Callender and McMasters 2011). Die verringerte Progressions-freie Zeit konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Hinsichtlich des Ulzerationsstadiums der Primarien wurde festgestellt, dass in Hochrisiko-Gruppe A 80% ulzeriert und 20% nicht ulzeriert waren. Im Gegensatz dazu betrug der Anteil der ulzerierten und nicht ulzerierten Primarien in Hochrisiko-Gruppe B jeweils 50%.

S100 β wird als serologischer Marker eingesetzt. Es hat sich vor allem bei Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium ein Zusammenhang von erhöhten S100 β -Leveln im Serum mit Metastasierung, Rezidiven und verkürztem Gesamtüberleben gezeigt (Tarhini et al. 2009; Weinstein et al. 2014). Diese Forschungsergebnisse werden durch die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. In der Kurzzeitüberleber-Gruppe betrug der gemessene S100 β -Wert im Serum +/- ein Monat nach der Diagnose von Stadium IV durchschnittlich 0,17 μ g/L, wohin gegen der Wert in der Langzeitüberleber-Gruppe lediglich bei durchschnittlich 0,07 μ g/L lag.

Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) wird als klinischer, serologischer Marker beim malignen Melanom eingesetzt. Er gilt als aussagekräftiger Marker, dessen Erhöhung mit einer erhöhten Tumorlast und schlechteren Prognose einhergeht (J. Zhang et al. 2015). Auch diese Erkenntnis spiegelt sich in den für diese Arbeit vorliegenden klinischen Daten wieder. Während der mittlere LDH-Wert im Serum +/- einen Monat nach Diagnose Stadium IV in der Kurzzeitüberleber-Gruppe 398.2 U/L betrug, zeigte sich in der Langzeitüberleber-Gruppe ein durchschnittlicher Wert von 238.2 U/L.

7. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein sehr aggressiver Hauttumor. Aufgrund der hohen und frühen Neigung zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung hat der schwarze Hautkrebs eine schlechte Prognose. Gängige Marker zur Prognoseabschätzung wie die Tumordicke nach Breslow, der Ulzerationsstatus des Primarius und der Befall des Wächterlymphknotens erlauben häufig nur eine ungenaue Abschätzung der Prognose, so dass weitere prognostische Marker benötigt werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expressionen spezifischer Gene, die sowohl in Neuralleistenzellen, den Vorläuferzellen der Melanozyten, als auch in Melanomzellen exprimiert werden, als prognostische Marker für den Verlauf einer Melanomerkrankung genutzt werden können. Unter der Annahme, dass Melanomzellen Eigenschaften ihrer Vorläuferzellen wiedergewinnen, wurden in einer vorangegangenen Arbeit Gene identifiziert, die sowohl in Neuralleistenzellen, als auch in Melanomzellen exprimiert werden. Hierbei handelt es sich um folgende Gene: GLDC, ERRFI1, TWIST, MSX1, PTPRF, TNFRSF21, TNFRSF12A und IGFBP2. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit der bekannte Neuralleistenzellmarker CD271 und der bekannte Proliferationsmarker Ki67 betrachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorproben von vier Patientengruppen immunhistochemisch untersucht. In der ersten Gruppe wurden Metastasen von Patienten untersucht, die nach Diagnosestellung eines malignen Melanoms im Stadium IV innerhalb von 12 Monaten verstarben. Diese Gruppe wurde einer Patientengruppe gegenübergestellt, die aus der gleichen Ausgangssituation länger als 30 Monate überleben. Darüber hinaus wurden Primarien mit der Tumordicke ≥ 2 mm von Patienten, die eine Metastase in 12 Monaten entwickelten mit einer weiteren Patientengruppe verglichen, in der Patienten zusammengefasst wurden, die einen Primarius der Tumordicke ≥ 2 mm aufwiesen, allerdings keine Metastase in 30 Monaten entwickelten.

Um die Genexpression zu quantifizieren, kamen Antikörper gegen Proteinprodukte der oben genannten Gene zum Einsatz. Anhand dieser immunhistochemischen Färbungen von Melanomschnitten wurden sogenannte IHC-Werte berechnet, die ein Maß für die Stärke der Expression der untersuchten Gene darstellten. Durch den Vergleich der IHC-Werte mit den Überlebensdaten der Patienten konnte eine Korrelation zwischen der Expression eines Gens und der Überlebenszeit bzw. dem Risiko, früh eine Metastase zu entwickeln, hergestellt werden. Die IHC-Werte, die aus

den Färbungen mit den Antikörpern gegen CD271, GLDC und ERRFI1 ermittelt wurden, zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten, die nach Diagnosestellung Stadium IV früh verstarben und denjenigen, die über 30 Monate überlebten. Bei Anti-CD271 und Anti-GLDC handelte es sich hierbei um einen IHC-Wert >8 , für Anti-ERRFI1 >9 . Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit dargestellt, dass Antikörper gegen CLDC und TWIST genutzt werden können, um eine Prognose hinsichtlich des Zeitpunkts der Metastasenentwicklung bei Hochrisikopatienten (Tumordicke ≥ 2 mm) abzugeben. Erhöhte IHC-Werte nach Färbungen mit diesen Antikörpern gehen mit einer früheren Metastasierung einher. Hier beträgt der IHC-Wert für Anti-GLDC > 9.33 . Der errechnete Grenzwert für Anti-TWIST betrug in der vorliegenden Arbeit 12. Da dies der höchst mögliche Wert ist, sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Grenzwert zu spezifizieren und ihn somit als klinisches Werkzeug einsetzbar zu machen. Sowohl die Expression von TWIST, als auch von MSX1, beide EMT-Marker, zeigte die Tendenz im Verlauf der Tumorprogression zu steigen. Hier lässt sich vermuten, dass sich die Genexpression beider Gene ebenfalls zur Prognoseabschätzung eignen könnte. Allerdings sind weitere Investigationen notwendig, um die Rolle dieser Gene während der Tumorentstehung und -progression zu untersuchen und eventuelle Nutzbarkeit zur Prognoseabstimmung zu ermitteln.

8. Literaturverzeichnis

- Abate-Shen, Cory. 2002. "Deregulated Homeobox Gene Expression in Cancer: Cause or Consequence?" *Nature Reviews. Cancer* 2 (10): 777–85. <https://doi.org/10.1038/nrc907>.
- Allin, Kristine H, and Borge G Nordestgaard. 2011. "Elevated C-Reactive Protein in the Diagnosis, Prognosis, and Cause of Cancer." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 48 (4): 155–70. <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.599831>.
- Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M., Winchester, D.P., Asare, E.A., Madera, L.R. (Eds.). 2017. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer International Publishing.
- Andtbacka, Robert H I, Howard L Kaufman, Frances Collichio, Thomas Amatruda, Neil Senzer, Jason Chesney, Keith A Delman, et al. 2015. "Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (25): 2780–88. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>.
- Bailey, Caleb M, Jason A Morrison, and Paul M Kulesa. 2012. "Melanoma Revives an Embryonic Migration Program to Promote Plasticity and Invasion." *Pigment Cell & Melanoma Research* 25 (5): 573–83. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.01025.x>.
- Balch, Charles M, Jeffrey E Gershenwald, Seng-Jaw Soong, John F Thompson, Michael B Atkins, David R Byrd, Antonio C Buzaid, et al. 2009. "Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (36): 6199–6206. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799>.
- Barker, Philip A. 2004. "P75NTR Is Positively Promiscuous: Novel Partners and New Insights." *Neuron* 42 (4): 529–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.04.001>.

- Baselga, Jose, and Sandra M Swain. 2009. "Novel Anticancer Targets: Revisiting ERBB2 and Discovering ERBB3." *Nature Reviews. Cancer* 9 (7): 463–75. <https://doi.org/10.1038/nrc2656>.
- Baxter, Laura L, R Travis Moreland, Anh-Dao Nguyen, Tyra G Wolfsberg, and William J Pavan. 2010. "A Curated Online Resource for SOX10 and Pigment Cell Molecular Genetic Pathways." *Database : The Journal of Biological Databases and Curation* 2010 (October): baq025. <https://doi.org/10.1093/database/baq025>.
- Bendall, A J, and C Abate-Shen. 2000. "Roles for Msx and Dlx Homeoproteins in Vertebrate Development." *Gene* 247 (1–2): 17–31.
- Benschop, Robert, Tao Wei, and Songqing Na. 2009. "Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 21: TNFR-Related Death Receptor-6, DR6." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 647: 186–94. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89520-8_13.
- Bera, Rabindranath, Chih-Yung Chiou, Ming-Chin Yu, Jei-Ming Peng, Chung-Ru He, Chih-Yun Hsu, Hsiao-Ling Huang, et al. 2014. "Functional Genomics Identified a Novel Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type F-Mediated Growth Inhibition in Hepatocarcinogenesis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (6): 2238–50. <https://doi.org/10.1002/hep.27030>.
- Bertz Joachim, Dahm Stefan, Haberland Jörg, Kraywinkel Klaus, Kurth Bärbel-Maria, Wolf Ute, and Unter. 2010. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung Der Prävalenzen Zwischen 1990 Und 2010. Beiträge Zur Gesundheitsberichtserstattung Des Bundes*.
- Boiko, Alexander D, Olga V Razorenova, Matt van de Rijn, Susan M Swetter, Denise L Johnson, Daphne P Ly, Paris D Butler, et al. 2010. "Human Melanoma-Initiating Cells Express Neural Crest Nerve Growth Factor Receptor CD271." *Nature* 466 (7302): 133–37. <https://doi.org/10.1038/nature09161>.
- Booth, Daniel G, Masatoshi Takagi, Luis Sanchez-Pulido, Elizabeth Petfalski, Giulia Vargiu, Kumiko Samejima, Naoko Imamoto, et al. 2014. "Ki-67 Is a PP1-Interacting Protein That Organises the Mitotic Chromosome Periphery." *ELife* 3 (May): e01641.

- Bosserhoff, A K, and R Buettner. 2002. "Expression, Function and Clinical Relevance of MIA (Melanoma Inhibitory Activity)." *Histology and Histopathology* 17 (1): 289–300. <https://doi.org/10.14670/HH-17.289>.
- Bosserhoff, A K, H Kuster, and R Hein. 2004. "Elevated MIA Levels in the Serum of Pregnant Women and of Children." *Clinical and Experimental Dermatology* 29 (6): 628–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01623.x>.
- Breitbart, Eckhard W, Annika Waldmann, Sandra Nolte, Marcus Capellaro, Ruediger Greinert, Beate Volkmer, and Alexander Katalinic. 2012. "Systematic Skin Cancer Screening in Northern Germany." *Journal of the American Academy of Dermatology* 66 (2): 201–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.11.016>.
- Breslow, A. 1970. "Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma." *Annals of Surgery* 172 (5): 902–8.
- Brunet, J F, F Denizot, M F Luciani, M Roux-Dosseto, M Suzan, M G Mattei, and P Golstein. 1987. "A New Member of the Immunoglobulin Superfamily--CTLA-4." *Nature* 328 (6127): 267–70. <https://doi.org/10.1038/328267a0>.
- Bullwinkel, Jorn, Bettina Baron-Luhr, Anja Ludemann, Claudia Wohlenberg, Johannes Gerdes, and Thomas Scholzen. 2006. "Ki-67 Protein Is Associated with Ribosomal RNA Transcription in Quiescent and Proliferating Cells." *Journal of Cellular Physiology* 206 (3): 624–35. <https://doi.org/10.1002/jcp.20494>.
- Busund, L-T, E Richardsen, R Busund, T Ukkonen, T Bjornsen, C Busch, and H Stalsberg. 2005. "Significant Expression of IGFBP2 in Breast Cancer Compared with Benign Lesions." *Journal of Clinical Pathology* 58 (4): 361–66. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.020834>.
- Byrne, Christopher M, John F Thompson, Heather Johnston, Peter Hersey, Michael J Quinn, T Michael Hughes, and William H McCarthy. 2005. "Treatment of Metastatic Melanoma Using Electroporation Therapy with Bleomycin (Electrochemotherapy)." *Melanoma Research* 15 (1): 45–51.
- Cabal-Hierro, Lucia, and Pedro S Lazo. 2012. "Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor Receptors." *Cellular Signalling* 24 (6): 1297–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.006>.

- Callender, Glenda G, and Kelly M McMasters. 2011. "What Does Ulceration of a Melanoma Mean for Prognosis?" *Advances in Surgery* 45: 225–36.
- Camacho, Luis H. 2015. "CTLA-4 Blockade with Ipilimumab: Biology, Safety, Efficacy, and Future Considerations." *Cancer Medicine* 4 (5): 661–72. <https://doi.org/10.1002/cam4.371>.
- Cao, M Gonzalez, J M Auge, R Molina, R Marti, C Carrera, T Castel, R Vilella, et al. 2007. "Melanoma Inhibiting Activity Protein (MIA), Beta-2 Microglobulin and Lactate Dehydrogenase (LDH) in Metastatic Melanoma." *Anticancer Research* 27 (1B): 595–99.
- Carvajal, Richard D, Jeffrey A Sosman, Jorge Fernando Quevedo, Mohammed M Milhem, Anthony M Joshua, Ragini R Kudchadkar, Gerald P Linette, et al. 2014. "Effect of Selumetinib vs Chemotherapy on Progression-Free Survival in Uveal Melanoma: A Randomized Clinical Trial." *JAMA* 311 (23): 2397–2405. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.6096>.
- Chang, Chung-Hsing, Rong-Kung Tsai, Ming-Hsien Tsai, Yi-Hsiung Lin, and Tomohisa Hirobe. 2014. "The Roles of Frizzled-3 and Wnt3a on Melanocyte Development: In Vitro Studies on Neural Crest Cells and Melanocyte Precursor Cell Lines." *Journal of Dermatological Science* 75 (2): 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.04.012>.
- Chao, Debra T, Mian Su, Sonia Tanlimco, Mien Sho, Donghee Choi, Mel Fox, Shiming Ye, et al. 2013. "Expression of TweakR in Breast Cancer and Preclinical Activity of Enavatuzumab, a Humanized Anti-TweakR MAb." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (2): 315–25. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1332-x>.
- Chen, Yi-Chun, E Scott Colvin, Bernhard F Maier, Raghavendra G Mirmira, and Patrick T Fueger. 2013. "Mitogen-Inducible Gene 6 Triggers Apoptosis and Exacerbates ER Stress-Induced Beta-Cell Death." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27 (1): 162–71. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1174>.

- Chesa, P G, W J Rettig, T M Thomson, L J Old, and M R Melamed. 1988. "Immunohistochemical Analysis of Nerve Growth Factor Receptor Expression in Normal and Malignant Human Tissues." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 36 (4): 383–89. <https://doi.org/10.1177/36.4.2831267>.
- Cho, Jin Hyun, Kyoung Mee Kim, Miyeon Kwon, Jung Han Kim, and Jeeyun Lee. 2012. "Nilotinib in Patients with Metastatic Melanoma Harboring KIT Gene Aberration." *Investigational New Drugs* 30 (5): 2008–14. <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9763-9>.
- Cichorek, Mirosława, Malgorzata Wachulska, Aneta Stasiewicz, and Agata Tyminska. 2013. "Skin Melanocytes: Biology and Development." *Postepy Dermatologii i Alergologii* 30 (1): 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>.
- Cillo, C, M Cantile, A Faiella, and E Boncinelli. 2001. "Homeobox Genes in Normal and Malignant Cells." *Journal of Cellular Physiology* 188 (2): 161–69. <https://doi.org/10.1002/jcp.1115>.
- Clewes, Oliver, Alla Narytnyk, Kevin R Gillinder, Andrew D Loughney, Alison P Murdoch, and Maya Sieber-Blum. 2011. "Human Epidermal Neural Crest Stem Cells (HEPI-NCSC)--Characterization and Directed Differentiation into Osteocytes and Melanocytes." *Stem Cell Reviews* 7 (4): 799–814. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9255-5>.
- Curtin, John A, Klaus Busam, Daniel Pinkel, and Boris C Bastian. 2006. "Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (26): 4340–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.2984>.
- Davies, Helen, Graham R Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. "Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer." *Nature* 417 (6892): 949–54. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- Dean, Nicola R, James Brennan, Julie Haynes, Christopher Goddard, and Rodney D Cooter. 2002. "Immunohistochemical Labeling of Normal Melanocytes." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM* 10 (3): 199–204.

- Deichmann, M, B Kahle, K Moser, J Wacker, and K Wust. 2004. "Diagnosing Melanoma Patients Entering American Joint Committee on Cancer Stage IV, C-Reactive Protein in Serum Is Superior to Lactate Dehydrogenase." *British Journal of Cancer* 91 (4): 699–702. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602043>.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2018. "S3-Leitlinie Zur Diagnostik , Therapie Und Nachsorge Des Melanoms," 1–275.
- Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2016. "S3-Leitlinie Zur Diagnostik, Therapie Und Nachsorge Des Malignen Melanoms." *Juli 2016*, 1–275. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-024OL.html>.
- Du, William W, Ling Fang, Minhui Li, Xiangling Yang, Yaoyun Liang, Chun Peng, Wei Qian, et al. 2013. "MicroRNA MiR-24 Enhances Tumor Invasion and Metastasis by Targeting PTPN9 and PTPRF to Promote EGF Signaling." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 6): 1440–53. <https://doi.org/10.1242/jcs.118299>.
- Dunlap, Sarah M, Joseph Celestino, Hua Wang, Rongcai Jiang, Eric C Holland, Gregory N Fuller, and Wei Zhang. 2007. "Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 Promotes Glioma Development and Progression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (28): 11736–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703145104>.
- Fiorentino, L, C Pertica, M Fiorini, C Talora, M Crescenzi, L Castellani, S Alema, P Benedetti, and O Segatto. 2000. "Inhibition of ErbB-2 Mitogenic and Transforming Activity by RALT, a Mitogen-Induced Signal Transducer Which Binds to the ErbB-2 Kinase Domain." *Molecular and Cellular Biology* 20 (20): 7735–50.
- Flaherty, Keith T, Caroline Robert, Peter Hersey, Paul Nathan, Claus Garbe, Mohammed Milhem, Lev V Demidov, et al. 2012. "Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 367 (2): 107–14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421>.

- Freeman, Scott R, Bethany B Gibbs, David G Brodland, and John A Zitelli. 2013. "Prognostic Value of Sentinel Lymph Node Biopsy Compared with That of Breslow Thickness: Implications for Informed Consent in Patients with Invasive Melanoma." *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery* [et Al.] 39 (12): 1800–1812. <https://doi.org/10.1111/dsu.12351>.
- Fukushima, Tsuyoshi, and Hiroaki Kataoka. 2007. "Roles of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2) in Glioblastoma." *Anticancer Research* 27 (6A): 3685–92.
- Fuller, G N, C H Rhee, K R Hess, L S Caskey, R Wang, J M Bruner, W K Yung, and W Zhang. 1999. "Reactivation of Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Revelation by Parallel Gene Expression Profiling." *Cancer Research* 59 (17): 4228–32.
- Garbe, C, P Buttner, J Weiss, H P Soyer, U Stocker, S Kruger, M Roser, J Weckbecker, R Panizzon, and F Bahmer. 1994. "Risk Factors for Developing Cutaneous Melanoma and Criteria for Identifying Persons at Risk: Multicenter Case-Control Study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society." *The Journal of Investigative Dermatology* 102 (5): 695–99.
- Gerdes, J, H Lemke, H Baisch, H H Wacker, U Schwab, and H Stein. 1984. "Cell Cycle Analysis of a Cell Proliferation-Associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-67." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (4): 1710–15.
- Gerdes, J, L Li, C Schlueter, M Duchrow, C Wohlenberg, C Gerlach, I Stahmer, S Kloth, E Brandt, and H D Flad. 1991. "Immunobiochemical and Molecular Biologic Characterization of the Cell Proliferation-Associated Nuclear Antigen That Is Defined by Monoclonal Antibody Ki-67." *The American Journal of Pathology* 138 (4): 867–73.
- Gerdes, J, U Schwab, H Lemke, and H Stein. 1983. "Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation." *International Journal of Cancer* 31 (1): 13–20.

- Gershenwald, Jeffrey E., Richard A. Scolyer, Kenneth R. Hess, Vernon K. Sondak, Georgina V. Long, Merrick I. Ross, Alexander J. Lazar, et al. 2017a. "Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (6). <https://doi.org/10.3322/caac.21409>.
- Gheldof, Alexander, and Geert Berx. 2013. "Cadherins and Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116: 317–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5>.
- Girgenrath, Mahasweta, Shawn Weng, Christine A Kostek, Beth Browning, Monica Wang, Sharron A N Brown, Jeffrey A Winkles, et al. 2006. "TWEAK, via Its Receptor Fn14, Is a Novel Regulator of Mesenchymal Progenitor Cells and Skeletal Muscle Regeneration." *The EMBO Journal* 25 (24): 5826–39. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601441>.
- Go, Maybelle Kho, Wen Cai Zhang, Bing Lim, and Wen Shan Yew. 2014. "Glycine Decarboxylase Is an Unusual Amino Acid Decarboxylase Involved in Tumorigenesis." *Biochemistry* 53 (5): 947–56. <https://doi.org/10.1021/bi4014227>.
- Gouti, Mina, James Briscoe, and Anthony Gavalas. 2011. "Anterior Hox Genes Interact with Components of the Neural Crest Specification Network to Induce Neural Crest Fates." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (5): 858–70. <https://doi.org/10.1002/stem.630>.
- Gown, A M, A M Vogel, D Hoak, F Gough, and M A McNutt. 1986. "Monoclonal Antibodies Specific for Melanocytic Tumors Distinguish Subpopulations of Melanocytes." *The American Journal of Pathology* 123 (2): 195–203.
- Gress, Donna M. 2017. "Seventh Edition Staging 2017 Melanoma."
- Grimberg, Adda, Carrie M Coleman, Zonggao Shi, Timothy F Burns, Timothy K MacLachlan, Wenge Wang, and Wafik S El-Deiry. 2006. "Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 Is a Novel Mediator of P53 Inhibition of Insulin-like Growth Factor Signaling." *Cancer Biology & Therapy* 5 (10): 1408–14.

- Grob, J J, J Gouvernet, D Aymar, A Mostaque, M H Romano, A M Collet, M C Noe, M P Diconstanzo, and J J Bonerandi. 1990. "Count of Benign Melanocytic Nevi as a Major Indicator of Risk for Nonfamilial Nodular and Superficial Spreading Melanoma." *Cancer* 66 (2): 387–95.
- Hackel, P O, M Gishizky, and A Ullrich. 2001. "Mig-6 Is a Negative Regulator of the Epidermal Growth Factor Receptor Signal." *Biological Chemistry* 382 (12): 1649–62. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.200>.
- Heppt, Markus V, Joshua X Wang, Denitsa M Hristova, Zhi Wei, Ling Li, Brianna Evans, Marilda Beqiri, et al. 2018. "MSX1-Induced Neural Crest-Like Reprogramming Promotes Melanoma Progression." *The Journal of Investigative Dermatology* 138 (1): 141–49. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.038>.
- Hodi, F Stephen, Christopher L Corless, Anita Giobbie-Hurder, Jonathan A Fletcher, Meijun Zhu, Adrian Marino-Enriquez, Philip Friedlander, et al. 2013. "Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (26): 3182–90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7836>.
- Hodi, F Stephen, Steven J O'Day, David F McDermott, Robert W Weber, Jeffrey A Sosman, John B Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 363 (8): 711–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>.
- Holly, E A, J W Kelly, S N Shpall, and S H Chiu. 1987. "Number of Melanocytic Nevi as a Major Risk Factor for Malignant Melanoma." *Journal of the American Academy of Dermatology* 17 (3): 459–68.
- Holmes, Kristen M, Matti Annala, Corrine Y X Chua, Sarah M Dunlap, Yuexin Liu, Niek Hugen, Lynette M Moore, et al. 2012. "Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2-Driven Glioma Progression Is Prevented by Blocking a Clinically Significant Integrin, Integrin-Linked Kinase, and NF-KappaB Network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9): 3475–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120375109>.

- Howard, T D, W A Paznekas, E D Green, L C Chiang, N Ma, R I Ortiz de Luna, C Garcia Delgado, M Gonzalez-Ramos, A D Kline, and E W Jabs. 1997. "Mutations in TWIST, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, in Saethre-Chotzen Syndrome." *Nature Genetics* 15 (1): 36–41. <https://doi.org/10.1038/ng0197-36>.
- Isshiki, Yoshiaki, Yasunori Kohchi, Hitoshi Iikura, Yasuaki Matsubara, Kohsuke Asoh, Takeshi Murata, Masami Kohchi, et al. 2011. "Design and Synthesis of Novel Allosteric MEK Inhibitor CH4987655 as an Orally Available Anticancer Agent." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (6): 1795–1801. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.062>.
- Jager, Katharina, Lionel Larribere, Huizi Wu, Christel Weiss, Christoffer Gebhardt, and Jochen Utikal. 2019. "Expression of Neural Crest Markers GLDC and ERFF1 Is Correlated with Melanoma Prognosis." *Cancers* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010076>.
- Jain, Mohit, Roland Nilsson, Sonia Sharma, Nikhil Madhusudhan, Toshimori Kitami, Amanda L Souza, Ran Kafri, Marc W Kirschner, Clary B Clish, and Vamsi K Mootha. 2012. "Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation." *Science (New York, N.Y.)* 336 (6084): 1040–44. <https://doi.org/10.1126/science.1218595>.
- Jakubowski, Aniela, Beth Browning, Matvey Lukashev, Irene Sizing, Jeffrey S Thompson, Christopher D Benjamin, Yen-Ming Hsu, Christine Ambrose, Timothy S Zheng, and Linda C Burkly. 2002. "Dual Role for TWEAK in Angiogenic Regulation." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 2): 267–74.
- Jiang, Xinni, MengMeng Niu, Deshi Chen, Jing Chen, Yang Cao, Xiaorong Li, Haoqiang Ying, Johann Bergholz, Yujun Zhang, and Zhi-Xiong Xiao. 2016. "Inhibition of Cdc42 Is Essential for Mig-6 Suppression of Cell Migration Induced by EGF." *Oncotarget* 7 (31): 49180–93. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10205>.
- Jing, Xin, Claire W Michael, and Constantine G A Theoharis. 2013. "The Use of Immunocytochemical Study in the Cytologic Diagnosis of Melanoma: Evaluation of Three Antibodies." *Diagnostic Cytopathology* 41 (2): 126–30. <https://doi.org/10.1002/dc.21791>.

- Johnson, DB, I Puzanov, and MC Kelley. 2015. "Advanced Melanoma." *Immunotherapy* 7 (6): 611–19. <https://doi.org/10.2217/imt.15.35>. Talimogene.
- Johnson, Douglas B, Megan H Pollack, and Jeffrey A Sosman. 2016. "Emerging Targeted Therapies for Melanoma." *Expert Opinion on Emerging Drugs* 21 (2): 195–207. <https://doi.org/10.1080/14728214.2016.1184644>.
- Jurikova, Miroslava, Ludovit Danihel, Stefan Polak, and Ivan Varga. 2016. "Ki67, PCNA, and MCM Proteins: Markers of Proliferation in the Diagnosis of Breast Cancer." *Acta Histochemica* 118 (5): 544–52. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>.
- Kashani-Sabet, M, R W Sagebiel, C M Ferreira, M Nosrati, and J R 3rd Miller. 2001. "Vascular Involvement in the Prognosis of Primary Cutaneous Melanoma." *Archives of Dermatology* 137 (9): 1169–73.
- Kaskel, P, C Berking, S Sander, M Volkenandt, R U Peter, and G Krahn. 1999. "S-100 Protein in Peripheral Blood: A Marker for Melanoma Metastases: A Prospective 2-Center Study of 570 Patients with Melanoma." *Journal of the American Academy of Dermatology* 41 (6): 962–69.
- Kasof, G M, J J Lu, D Liu, B Speer, K N Mongan, B C Gomes, and M V Lorenzi. 2001. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces the Expression of DR6, a Member of the TNF Receptor Family, through Activation of NF-KappaB." *Oncogene* 20 (55): 7965–75. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204985>.
- Khan, Md Asaduzzaman, Han-chun Chen, Dianzheng Zhang, and Junjiang Fu. 2013. "Twist: A Molecular Target in Cancer Therapeutics." *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (5): 2497–2506. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1002-x>.
- Knecht, Anne K, and Marianne Bronner-Fraser. 2002. "Induction of the Neural Crest: A Multigene Process." *Nature Reviews. Genetics* 3 (6): 453–61. <https://doi.org/10.1038/nrg819>.

- Kononen, J, L Bubendorf, A Kallioniemi, M Barlund, P Schraml, S Leighton, J Torhorst, M J Mihatsch, G Sauter, and O P Kallioniemi. 1998. "Tissue Microarrays for High-Throughput Molecular Profiling of Tumor Specimens." *Nature Medicine* 4 (7): 844–47.
- Krygier, Scott, and Daniel Djakiew. 2002. "Neurotrophin Receptor P75(NTR) Suppresses Growth and Nerve Growth Factor-Mediated Metastasis of Human Prostate Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 98 (1): 1–7.
- Larkin, James, Paolo A Ascierto, Brigitte Dreno, Victoria Atkinson, Gabriella Liszkay, Michele Maio, Mario Mandala, et al. 2014. "Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 371 (20): 1867–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408868>.
- Larkin, James, Vanna Chiarion-Sileni, Rene Gonzalez, Jean Jacques Grob, C Lance Cowey, Christopher D Lao, Dirk Schadendorf, et al. 2015. "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 373 (1): 23–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504030>.
- Lasithiotakis, Konstantinos, Ulrike Leiter, Friedegund Meier, Thomas Eigentler, Gizela Metzler, Matthias Moehrl, Helmut Breuninger, and Claus Garbe. 2008. "Age and Gender Are Significant Independent Predictors of Survival in Primary Cutaneous Melanoma." *Cancer* 112 (8): 1795–1804. <https://doi.org/10.1002/cncr.23359>.
- Leiter, Ulrike, Friedegund Meier, Birgit Schitteck, and Claus Garbe. 2004. "The Natural Course of Cutaneous Melanoma." *Journal of Surgical Oncology* 86 (4): 172–78. <https://doi.org/10.1002/jso.20079>.
- Liu, Haiying, Mousa Komai-Koma, Damo Xu, and Foo Y. Liew. 2006. "Toll-like Receptor 2 Signaling Modulates the Functions of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (18): 7048–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601554103>.
- Liu, Wanting, Yonghong Peng, and Desmond J Tobin. 2013. "A New 12-Gene Diagnostic Biomarker Signature of Melanoma Revealed by Integrated Microarray Analysis." *PeerJ* 1: e49. <https://doi.org/10.7717/peerj.49>.

- Long, Georgina V, Axel Hauschild, Mario Santinami, Victoria Atkinson, Mario Mandala, Vanna Chiarion-Sileni, James Larkin, et al. 2017. "Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 377 (19): 1813–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708539>.
- Mani, Sendurai A, Jing Yang, Mary Brooks, Gunda Schwaninger, Alicia Zhou, Naoyuki Miura, Jeffery L Kutok, Kimberly Hartwell, Andrea L Richardson, and Robert A Weinberg. 2007. "Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) Plays a Key Role in Metastasis and Is Associated with Aggressive Basal-like Breast Cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24): 10069–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703900104>.
- Mccoy, By Kathy D, Ian F Hermans, J Henry Fraser, and Graham Le Gros. 1999. "Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 (CTLA-4) Can Regulate Dendritic Cell-induced Activation and Cytotoxicity of CD8" 189 (7): 1157–62.
- Mehrian-Shai, R, C D Chen, T Shi, S Horvath, S F Nelson, J K V Reichardt, and C L Sawyers. 2007. "Insulin Growth Factor-Binding Protein 2 Is a Candidate Biomarker for PTEN Status and PI3K/Akt Pathway Activation in Glioblastoma and Prostate Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (13): 5563–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609139104>.
- Meral, R, D Duranyildiz, F Tas, H Camlica, V Yasasever, S Kurul, and N Dalay. 2001. "Prognostic Significance of Melanoma Inhibiting Activity Levels in Malignant Melanoma." *Melanoma Research* 11 (6): 627–32.
- Mervic, Liljana. 2012. "Prognostic Factors in Patients with Localized Primary Cutaneous Melanoma." *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica, et Adriatica* 21 (2): 27–31.
- Middleton, M R, P Lorigan, J Owen, L Ashcroft, S M Lee, P Harper, and N Thatcher. 2000. "A Randomized Phase III Study Comparing Dacarbazine, BCNU, Cisplatin and Tamoxifen with Dacarbazine and Interferon in Advanced Melanoma." *British Journal of Cancer* 82 (6): 1158–62. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1056>.

- Miettinen, M, M Fernandez, K Franssila, Z Gatalica, J Lasota, and M Sarlomo-Rikala. 2001. "Microphthalmia Transcription Factor in the Immunohistochemical Diagnosis of Metastatic Melanoma: Comparison with Four Other Melanoma Markers." *The American Journal of Surgical Pathology* 25 (2): 205–11.
- Mironchik, Yelena, Paul T Jr Winnard, Farhad Vesuna, Yoshinori Kato, Flonne Wildes, Arvind P Pathak, Scott Kominsky, et al. 2005. "Twist Overexpression Induces in Vivo Angiogenesis and Correlates with Chromosomal Instability in Breast Cancer." *Cancer Research* 65 (23): 10801–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0712>.
- Mocellin, Simone, Giorgio Zavagno, and Donato Nitti. 2008. "The Prognostic Value of Serum S100B in Patients with Cutaneous Melanoma: A Meta-Analysis." *International Journal of Cancer* 123 (10): 2370–76. <https://doi.org/10.1002/ijc.23794>.
- Moll Ingrid, Bahmer Friedrich A., Bahmer Judith, Bayerl Christiane, Boonen Hugo P.J. 2016. *Dermatologie*. 8. Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Molloy, Niamh H, Danielle E Read, and Adrienne M Gorman. 2011. "Nerve Growth Factor in Cancer Cell Death and Survival." *Cancers* 3 (1): 510–30. <https://doi.org/10.3390/cancers3010510>.
- Moreno-Ramirez, David, Luis de la Cruz-Merino, Lara Ferrandiz, Roman Villegas-Portero, and Adoracion Nieto-Garcia. 2010. "Isolated Limb Perfusion for Malignant Melanoma: Systematic Review on Effectiveness and Safety." *The Oncologist* 15 (4): 416–27. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0325>.
- Mort, Richard L, Ian J Jackson, and E Elizabeth Patton. 2015. "The Melanocyte Lineage in Development and Disease." *Development (Cambridge, England)* 142 (4): 620–32. <https://doi.org/10.1242/dev.106567>.
- Morton, D L, L Wanek, J A Nizze, R M Elashoff, and J H Wong. 1991. "Improved Long-Term Survival after Lymphadenectomy of Melanoma Metastatic to Regional Nodes. Analysis of Prognostic Factors in 1134 Patients from the John Wayne Cancer Clinic." *Annals of Surgery* 214 (4): 491–501.

- Morton, Donald L, John F Thompson, Alistair J Cochran, Nicola Mozzillo, Omgo E Nieweg, Daniel F Roses, Harold J Hoekstra, et al. 2014. "Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 370 (7): 599–609. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310460>.
- Munsch, Coline, Valerie Lauwers-Cances, Laurence Lamant, Catherine Gentil, Philippe Rochaix, Ignacio Garrido, Raphael Lopez, Christine Chevreau, Carle Paul, and Nicolas Meyer. 2014. "Breslow Thickness, Clark Index and Ulceration Are Associated with Sentinel Lymph Node Metastasis in Melanoma Patients: A Cohort Analysis of 612 Patients." *Dermatology (Basel, Switzerland)* 229 (3): 183–89. <https://doi.org/10.1159/000362902>.
- Nakayama, Masafumi, Kazumi Ishidoh, Nobuhiko Kayagaki, Yuko Kojima, Noriko Yamaguchi, Hiroyasu Nakano, Eiki Kominami, Ko Okumura, and Hideo Yagita. 2002. "Multiple Pathways of TWEAK-Induced Cell Death." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (2): 734–43.
- Onder, Tamer T, Piyush B Gupta, Sendurai A Mani, Jing Yang, Eric S Lander, and Robert A Weinberg. 2008. "Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways." *Cancer Research* 68 (10): 3645–54. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>.
- Ordonez, Nelson G. 2014. "Value of Melanocytic-Associated Immunohistochemical Markers in the Diagnosis of Malignant Melanoma: A Review and Update." *Human Pathology* 45 (2): 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.02.007>.
- Ott, Patrick A, Omid Hamid, Anna C Pavlick, Harriet Kluger, Kevin B Kim, Peter D Boasberg, Ronit Simantov, et al. 2014. "JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Phase I / II Study of the Antibody-Drug Conjugate Glembatumumab Vedotin in Patients With Advanced Melanoma" 32 (32). <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.8115>.
- Pal, Harish Chandra, Katherine Marchiony Hunt, Ariana Diamond, Craig A Elmets, and Farrukh Afaq. 2016. "Phytochemicals for the Management of Melanoma." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 16 (12): 953–79.

- Pan, G, J H Bauer, V Haridas, S Wang, D Liu, G Yu, C Vincenz, B B Aggarwal, J Ni, and V M Dixit. 1998. "Identification and Functional Characterization of DR6, a Novel Death Domain-Containing TNF Receptor." *FEBS Letters* 431 (3): 351–56.
- Papadaki, Maria A, Galatea Kallergi, Zafeiris Zafeiriou, Lefteris Manouras, Panayiotis A Theodoropoulos, Dimitris Mavroudis, Vassilis Georgoulas, and Sofia Agelaki. 2014. "Co-Expression of Putative Stemness and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Markers on Single Circulating Tumour Cells from Patients with Early and Metastatic Breast Cancer." *BMC Cancer* 14 (September): 651. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-651>.
- Pasquali, Sandro, Andreas V Hadjinicolaou, Vanna Chiarion Sileni, Carlo Riccardo Rossi, and Simone Mocellin. 2018. "Systemic Treatments for Metastatic Cutaneous Melanoma." *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2 (February): CD011123. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011123.pub2>.
- Peyssonnaud, C, and A Eychene. 2001. "The Raf/MEK/ERK Pathway: New Concepts of Activation." *Biology of the Cell* 93 (1–2): 53–62.
- Postow, Michael A, Jason Chesney, Anna C Pavlick, Caroline Robert, Kenneth Grossmann, David McDermott, Gerald P Linette, et al. 2015. "Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 372 (21): 2006–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414428>.
- Redman, Jason M, Geoffrey T Gibney, and Michael B Atkins. 2016. "Advances in Immunotherapy for Melanoma." *BMC Medicine* 14 (February): 20. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0571-0>.
- Robert-Koch-Institut. 2012. *Krebs in Deutschland 2007-2008. Häufigkeiten Und Trends. Gesundheitsberichterstattung Des Bundes*. <http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?id=80954>.
- Robert, Caroline, Boguslawa Karaszewska, Jacob Schachter, Piotr Rutkowski, Andrzej Mackiewicz, Daniil Stroiakovski, Michael Lichinitser, et al. 2015. "Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib." *The New England Journal of Medicine* 372 (1): 30–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412690>.

- Robert, Caroline, Jacob Schachter, Georgina V Long, Ana Arance, Jean Jacques Grob, Laurent Mortier, Adil Daud, et al. 2015. "Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 372 (26): 2521–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>.
- Robert Koch-Institut. 2016. "Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016." *Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum Für Krebsregisterdaten Im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, 2016, 16–77.* <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>.
- Schachter, Jacob, Antoni Ribas, Georgina V Long, Ana Arance, Jean-Jacques Grob, Laurent Mortier, Adil Daud, et al. 2017. "Pembrolizumab versus Ipilimumab for Advanced Melanoma: Final Overall Survival Results of a Multicentre, Randomised, Open-Label Phase 3 Study (KEYNOTE-006)." *Lancet (London, England)* 390 (10105): 1853–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31601-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31601-X).
- Schatton, Tobias, George F Murphy, Natasha Y Frank, Kazuhiro Yamaura, Ana Maria Waaga-Gasser, Martin Gasser, Qian Zhan, et al. 2008. "Identification of Cells Initiating Human Melanomas." *Nature* 451 (7176): 345–49. <https://doi.org/10.1038/nature06489>.
- Schmidt, Clint S, Jinqi Liu, Tonghai Zhang, Ho Yeong Song, George Sandusky, Karen Mintze, Robert J Benschop, Andrew Glasebrook, Derek D Yang, and Songqing Na. 2003. "Enhanced B Cell Expansion, Survival, and Humoral Responses by Targeting Death Receptor 6." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (1): 51–62.
- Scoggins, Charles R, Merrick I Ross, Douglas S Reintgen, R Dirk Noyes, James S Goydos, Peter D Beitsch, Marshall M Urist, et al. 2006. "Gender-Related Differences in Outcome for Melanoma Patients." *Annals of Surgery* 243 (5): 693–700. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000216771.81362.6b>.

- Scolyer, Richard A, Meagan J Judge, Alan Evans, David P Frishberg, Victor G Prieto, John F Thompson, Martin J Trotter, Maureen Y Walsh, Noreen M G Walsh, and David W Ellis. 2013. "Data Set for Pathology Reporting of Cutaneous Invasive Melanoma: Recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR)." *The American Journal of Surgical Pathology* 37 (12): 1797–1814. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31829d7f35>.
- Sersa, G, B Stabuc, M Cemazar, D Miklavcic, and Z Rudolf. 2000. "Electrochemotherapy with Cisplatin: Clinical Experience in Malignant Melanoma Patients." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (3): 863–67.
- Shin, Minsang, Hye Suk Kang, Jae Hyung Park, Jae Hoon Bae, Dae Kyu Song, and Seung Soon Im. 2017. "Recent Insights into Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 Transcriptional Regulation." *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)* 32 (1): 11–17. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.1.11>.
- Shiota, Masaki, Akira Yokomizo, Momoe Itsumi, Takeshi Uchiumi, Yasuhiro Tada, YooHyun Song, Eiji Kashiwagi, Daisuke Masubuchi, and Seiji Naito. 2011. "Twist1 and Y-Box-Binding Protein-1 Promote Malignant Potential in Bladder Cancer Cells." *BJU International* 108 (2 Pt 2): E142-9. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09810.x>.
- Silver, Debra L, Ling Hou, and William J Pavan. 2006. "The Genetic Regulation of Pigment Cell Development." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 589: 155–69. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_9.
- Sladden, Michael J, Charles Balch, David A Barzilai, Daniel Berg, Anatoli Freiman, Teenah Handiside, Sally Hollis, Marko B Lens, and John F Thompson. 2009. "Surgical Excision Margins for Primary Cutaneous Melanoma." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 4 (October): CD004835. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004835.pub2>.
- Starborg, M, K Gell, E Brundell, and C Hoog. 1996. "The Murine Ki-67 Cell Proliferation Antigen Accumulates in the Nucleolar and Heterochromatic Regions of Interphase Cells and at the Periphery of the Mitotic Chromosomes in a Process Essential for Cell Cycle Progression." *Journal of Cell Science* 109 (Pt 1 (January): 143–53.

- Stoletov, Konstantin, Hisashi Kato, Erin Zardouzan, Jonathan Kelber, Jing Yang, Sanford Shattil, and Richard Klemke. 2010. "Visualizing Extravasation Dynamics of Metastatic Tumor Cells." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 13): 2332–41. <https://doi.org/10.1242/jcs.069443>.
- Tabassum, Arshia, Fatima Khwaja, and Daniel Djakiew. 2003. "The P75(NTR) Tumor Suppressor Induces Caspase-Mediated Apoptosis in Bladder Tumor Cells." *International Journal of Cancer* 105 (1): 47–52. <https://doi.org/10.1002/ijc.11038>.
- Tang, Huifang, Daniela Massi, Brian A Hemmings, Mario Mandala, Zhengqiang Hu, Andreas Wicki, and Gongda Xue. 2016. "AKT-Ions with a TWIST between EMT and MET." *Oncotarget* 7 (38): 62767–77. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11232>.
- Tarhini, Ahmad A, Joseph Stuckert, Sandra Lee, Cindy Sander, and John M Kirkwood. 2009. "Prognostic Significance of Serum S100B Protein in High-Risk Surgically Resected Melanoma Patients Participating in Intergroup Trial ECOG 1694." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (1): 38–44. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.1777>.
- Thompson, John F, Seng-Jaw Soong, Charles M Balch, Jeffrey E Gershenwald, Shouluan Ding, Daniel G Coit, Keith T Flaherty, et al. 2011. "Prognostic Significance of Mitotic Rate in Localized Primary Cutaneous Melanoma: An Analysis of Patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (16): 2199–2205. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.5812>.
- Tran, Nhan L, Wendy S McDonough, Benjamin A Savitch, Shannon P Fortin, Jeffrey A Winkles, Marc Symons, Mitsutoshi Nakada, et al. 2006. "Increased Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Expression Levels Promote Glioma Cell Invasion via Rac1 and Nuclear Factor-KappaB and Correlate with Poor Patient Outcome." *Cancer Research* 66 (19): 9535–42. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0418>.

- Truzzi, Francesca, Annalisa Saltari, Elisabetta Palazzo, Roberta Lotti, Tiziana Petrachi, Katuscia Dallaglio, Claudia Gemelli, et al. 2015. "CD271 Mediates Stem Cells to Early Progeny Transition in Human Epidermis." *The Journal of Investigative Dermatology* 135 (3): 786–95. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.454>.
- Ugurel, Selma, Joachim Rohmel, Paolo A Ascierto, Keith T Flaherty, Jean Jacques Grob, Axel Hauschild, James Larkin, et al. 2016. "Survival of Patients with Advanced Metastatic Melanoma: The Impact of Novel Therapies." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 53 (January): 125–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.013>.
- Utikal, Jochen, Jose M Polo, Matthias Stadtfeld, Nimet Maherali, Warakorn Kulalert, Ryan M Walsh, Adam Khalil, James G Rheinwald, and Konrad Hochedlinger. 2009. "Immortalization Eliminates a Roadblock during Cellular Reprogramming into IPS Cells." *Nature* 460 (7259): 1145–48. <https://doi.org/10.1038/nature08285>.
- Vanneste, David, Masatoshi Takagi, Naoko Imamoto, and Isabelle Vernos. 2009. "The Role of Hklp2 in the Stabilization and Maintenance of Spindle Bipolarity." *Current Biology: CB* 19 (20): 1712–17. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.019>.
- Vereecken, Pierre, Frank Cornelis, Nicolas Van Baren, Valerie Vandersleyen, and Jean-Francois Baurain. 2012. "A Synopsis of Serum Biomarkers in Cutaneous Melanoma Patients." *Dermatology Research and Practice* 2012: 260643. <https://doi.org/10.1155/2012/260643>.
- Vu, Ha Linh, Sheera Rosenbaum, Claudia Capparelli, Timothy J Purwin, Michael A Davies, Adam C Berger, and Andrew E Aplin. 2016. "MIG6 Is MEK Regulated and Affects EGF-Induced Migration in Mutant NRAS Melanoma." *The Journal of Investigative Dermatology* 136 (2): 453–63. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.012>.
- Wagner, Nikolaus B, Benjamin Weide, Maike Reith, Kathrin Tarnanidis, Coretta Kehrel, Ramtin Lichtenberger, Annette Pflugfelder, et al. 2015. "Diminished Levels of the Soluble Form of RAGE Are Related to Poor Survival in Malignant Melanoma." *International Journal of Cancer* 137 (11): 2607–17. <https://doi.org/10.1002/ijc.29619>.

- Wang, George K, Limei Hu, Gregory N Fuller, and Wei Zhang. 2006. "An Interaction between Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2 (IGFBP2) and Integrin Alpha5 Is Essential for IGFBP2-Induced Cell Mobility." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 14085–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513686200>.
- Wang, Timothy S, Timothy M Johnson, Phillip N Cascade, Bruce G Redman, Vernon K Sondak, and Jennifer L Schwartz. 2004. "Evaluation of Staging Chest Radiographs and Serum Lactate Dehydrogenase for Localized Melanoma." *Journal of the American Academy of Dermatology* 51 (3): 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.02.017>.
- Weber, Jeffrey, Mario Mandala, Michele Del Vecchio, Helen J Gogas, Ana M Arance, C Lance Cowey, Stephane Dalle, et al. 2017. "Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 377 (19): 1824–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709030>.
- Weide, Benjamin, Thomas Kurt Eigentler, Annette Pflugfelder, Ulrike Leiter, Friedegund Meier, Jurgen Bauer, Diethard Schmidt, Peter Radny, Claudia Pfohler, and Claus Garbe. 2011. "Survival after Intratumoral Interleukin-2 Treatment of 72 Melanoma Patients and Response upon the First Chemotherapy during Follow-Up." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 60 (4): 487–93. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0957-3>.
- Weinstein, David, Jennifer Leininger, Carl Hamby, and Bijan Safai. 2014. "Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma." *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 7 (6): 13–24.
- Wick, M, C Burger, M Funk, and R Muller. 1995. "Identification of a Novel Mitogen-Inducible Gene (Mig-6): Regulation during G1 Progression and Differentiation." *Experimental Cell Research* 219 (2): 527–35. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1261>.
- Winkles, Jeffrey A. 2008. "The TWEAK-Fn14 Cytokine-Receptor Axis: Discovery, Biology and Therapeutic Targeting." *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (5): 411–25. <https://doi.org/10.1038/nrd2488>.

- Winkles, Jeffrey A, Nhan L Tran, and Michael E Berens. 2006. "TWEAK and Fn14: New Molecular Targets for Cancer Therapy?" *Cancer Letters* 235 (1): 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.048>.
- Wu, Huizi, Lionel Larribere, Qian Sun, Daniel Novak, Sachindra Sachindra, Karol Granados, Viktor Umansky, and Jochen Utikal. 2018. "Loss of Neural Crest-Associated Gene FOXD1 Impairs Melanoma Invasion and Migration via RAC1B Downregulation." *International Journal of Cancer* 143 (11): 2962–72. <https://doi.org/10.1002/ijc.31799>.
- Yang, Jing, Sendurai A Mani, Joana Liu Donaher, Sridhar Ramaswamy, Raphael A Itzykson, Christophe Come, Pierre Savagner, Inna Gitelman, Andrea Richardson, and Robert A Weinberg. 2004. "Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis." *Cell* 117 (7): 927–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>.
- Yao, Xiaofeng, Shanshan Sun, Xuan Zhou, Wenyu Guo, and Lun Zhang. 2016. "IGF-Binding Protein 2 Is a Candidate Target of Therapeutic Potential in Cancer." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (2): 1451–59. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4561-1>.
- Yazawa, Takuya, Hanako Sato, Hiroaki Shimoyamada, Koji Okudela, Tetsukan Woo, Michihiko Tajiri, Takashi Ogura, et al. 2009. "Neuroendocrine Cancer-Specific up-Regulating Mechanism of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 in Small Cell Lung Cancer." *American Journal of Pathology* 175 (3): 976–87. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081004>.
- Zhang, Jiao, Yan-Hong Yao, Bao-Guo Li, Qing Yang, Peng-Yu Zhang, and Hai-Tao Wang. 2015. "Prognostic Value of Pretreatment Serum Lactate Dehydrogenase Level in Patients with Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Scientific Reports* 5 (April): 9800. <https://doi.org/10.1038/srep09800>.
- Zhang, Wen Cai, Ng Shyh-Chang, He Yang, Amit Rai, Shivshankar Umashankar, Siming Ma, Boon Seng Soh, et al. 2012. "Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung Cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis." *Cell* 148 (1–2): 259–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.050>.

- Zhang, Yu-Wen, and George F Vande Woude. 2007. "Mig-6, Signal Transduction, Stress Response and Cancer." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (5): 507–13. <https://doi.org/10.4161/cc.6.5.3928>.
- Zhou, Xiang, Qian Hao, Peng Liao, Shiwen Luo, Minhong Zhang, Guohui Hu, Hongbing Liu, et al. 2016. "Nerve Growth Factor Receptor Negates the Tumor Suppressor P53 as a Feedback Regulator." *ELife* 5 (June). <https://doi.org/10.7554/eLife.15099>.

9. Anhang

Tabelle A: TMN-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) aus dem Jahr 2017

Definition of Primary Tumor (T)		
T Category	Thickness	Ulceration
TX: Primary tumor thickness cannot be assessed (eg, diagnosis by curettage)	Not applicable	Not applicable
T0: No evidence of primary tumor (eg, unknown primary or completely regressed melanoma)	Not applicable	Not applicable
Tis (melanoma in situ)	Not applicable	Not applicable
T1	<1.0 mm	Unknown or unspecified
T1a	<0.8 mm	Without ulceration
T1b	<0.8 mm	With ulceration
	0.8 mm-1.0 mm	With or without ulceration
T2	>1.0-2.0 mm	Unknown or unspecified
T2a	>1.0-2.0 mm	Without ulceration
T2b	>1.0-2.0 mm	With ulceration
T3	>2.0-4.0 mm	Unknown or unspecified
T3a	>2.0-4.0 mm	Without ulceration
T3b	>2.0-4.0 mm	With ulceration
T4	>4.0 mm	Unknown or unspecified
T4a	>4.0 mm	Without ulceration
T4b	>4.0 mm	With ulceration

Definition of Regional Lymph Node (N)		
Extent of regional lymph node and/or lymphatic metastasis		
N Category	No. of tumor-involved regional lymph nodes	Presence of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases
NX	Regional nodes not assessed (eg, sentinel lymph node [SLN] biopsy not performed, regional nodes previously removed for another reason); Exception: pathological N category is not required for T1 melanomas, use clinical N information	No
N0	No regional metastases detected	No
N1	One tumor-involved node or any number of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with no tumor-involved nodes	
N1a	One clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N1b	One clinically detected	No
N1c	No regional lymph node disease	Yes
N2	Two or 3 tumor-involved nodes or any number of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with one tumor-involved node	
N2a	Two or 3 clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N2b	Two or 3, at least one of which was clinically detected	No
N2c	One clinically occult or clinically detected	Yes
N3	Four or more tumor-involved nodes or any number of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with 2 or more tumor-involved nodes, or any number of matted nodes without or with in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases	
N3a	Four or more clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N3b	Four or more, at least one of which was clinically detected, or the presence of any number of matted nodes	No
N3c	Two or more clinically occult or clinically detected and/or presence of any number of matted nodes	Yes

Definition of Distant Metastasis (M)		
M Criteria		
M Category	Anatomic Site	LHD Level
M0	No evidence of distant metastasis	Not applicable
M1	Evidence of distant metastasis	See below
M1a	Distant metastasis to skin, soft tissue including muscle, and/or nonregional lymph node	Not recorded or unspecified
M1a(0)		Not elevated
M1a(1)		Elevated
M1b	Distant metastasis to lung with or without M1a sites of disease	Not recorded or unspecified
M1b(0)		Not elevated
M1b(1)		Elevated
M1c	Distant metastasis to non-CNS visceral sites with or without M1a or M1b sites of disease	Not recorded or unspecified
M1c(0)		Not elevated
M1c(1)		Elevated
M1d	Distant metastasis to CNS with or without M1a, M1b, or M1c sites of disease	Not recorded or unspecified
M1d(0)		Not elevated
M1d(1)		Elevated
CNS indicates central nervous system; LDH, lactate dehydrogenase.		
(Gershenwald et al. 2017a)		

Tabelle B: Stadieneinteilung des Malignen Melanoms der AJCC (American Joint Committee on Cancer) aus dem Jahr 2017

AJCC Clinical Prognostic Stage Groups (cTNM)			
When T is ...	And N is ...	And M is ...	Then the clinical stage group is ...
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Any T, Tis	≥N1	M0	III
Any T	Any N	M1	IV
(Amin et al. 2017)			

Abbildung A: Übersicht: Färbeintensität der signifikanten Antikörper Anti-CD271, Anti-GLDC und Anti-ERRFI1

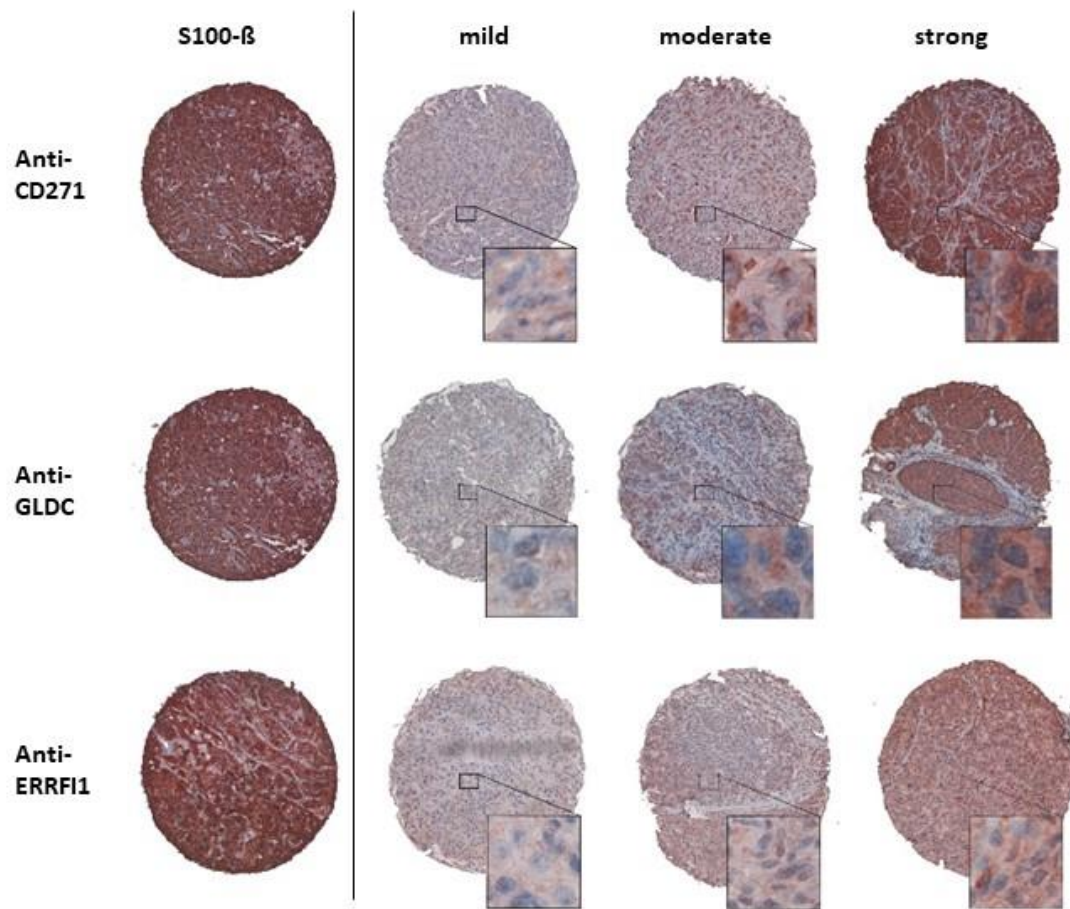
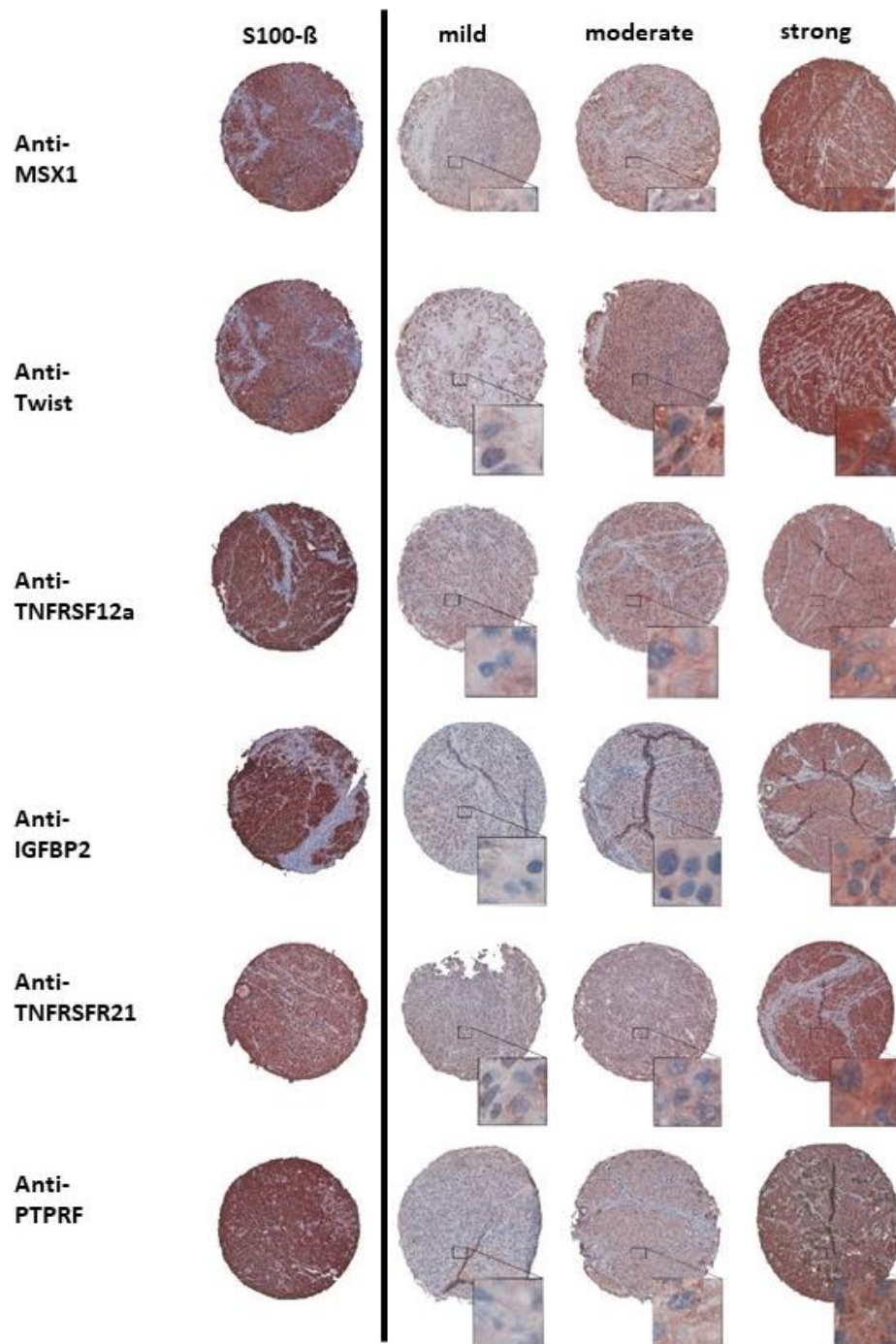


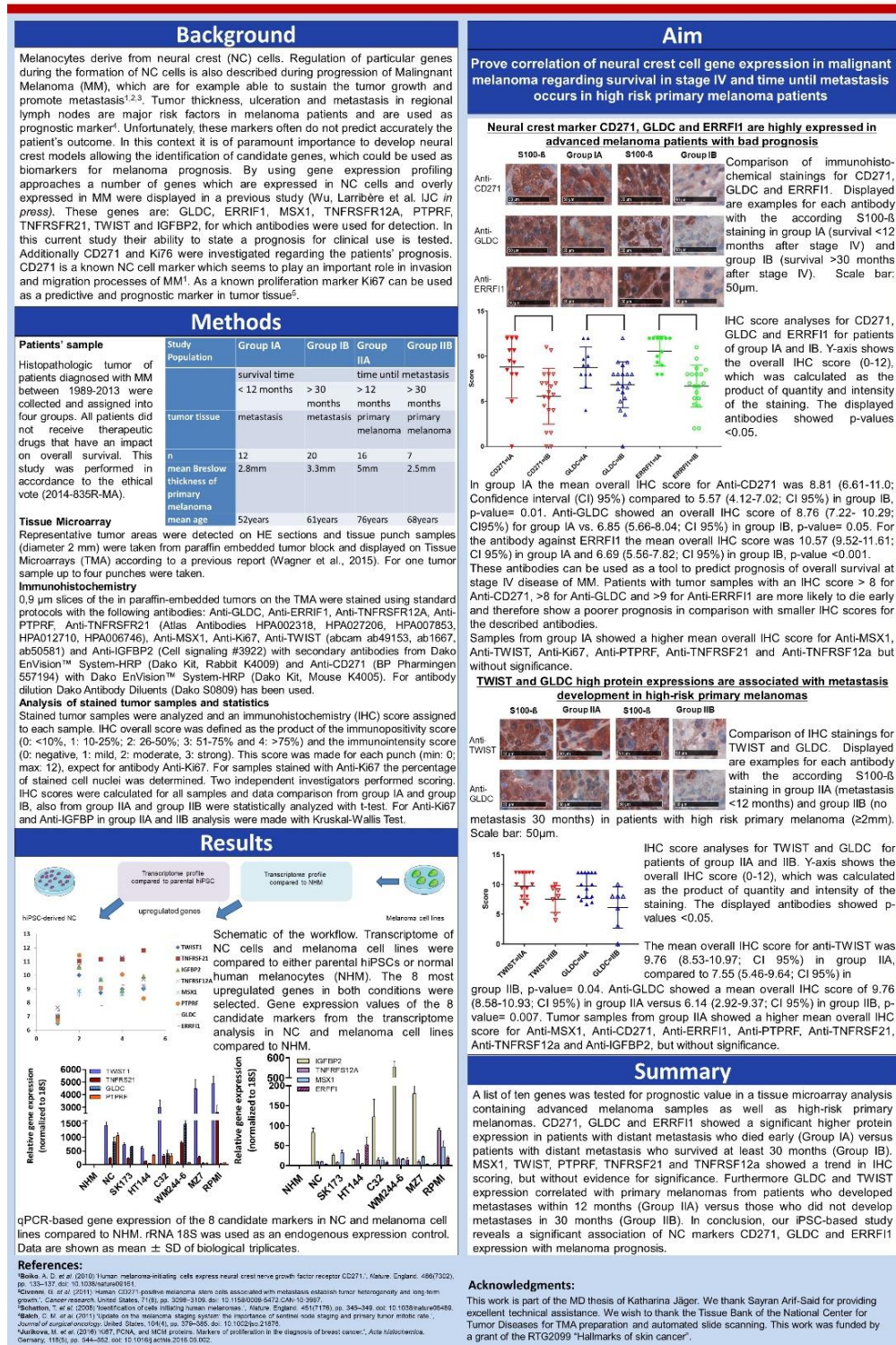
Abbildung B: Übersicht: Färbeintensität der Antikörper Anti-MXS1, Anti-TWIST, Anti-TNFRSF12A, Anti-IGFBP2, Anti-TNFRSF21 und Anti-PTPRF



Neural crest marker expression in melanoma

Katharina Jäger^{1,2}, Lionel Larribère^{1,2}, Huizi Wu^{1,2}, Christel Weiss³, Christoffer Gebhardt^{1,2}, Jochen Utikal^{1,2}

Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center (DKFZ) Heidelberg¹, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, University Medical Center Mannheim², Institute for Medical Statistics³, Medical Faculty Mannheim, Ruprecht-Karl University of Heidelberg, Mannheim



10. Lebenslauf

Daten zur Person:

Katharina C. Jäger, geb. 03.05.1993

Richard-Wagner-Straße 7/2

69121 Heidelberg

rina.jaeger@yahoo.de

Ausbildung:

11.2018	Approbobation, 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07.2018-10.2018	PJ-Tertial im Bereich Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Frankenberg
05.2018-07.2018	PJ im Bereich Chirurgie, Nepean Hospital, Sydney, Australien
03.2018-05.2018	PJ im Bereich Chirurgie, St. Marien-Krankenhaus Siegen
11.2017-03.2018	PJ-Tertial im Bereich Dermatologie, Universitätsklinikum Mannheim
2015-vsl. 2019	Promotion Universität Mannheim, Dermatologie, Prognostische immunhistochemische Marker beim Malignen Melanom
10.2017	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
8/9.2014	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/12- 11/18	Humanmedizinstudium an der Philipps-Universität, Marburg
08/03 – 07/12	Carl-Benz-Gymnasium, Ladenburg Abitur im naturwissenschaftlichen Zweig
08/99 – 07/03	Kurpfalz-Grundschule, Dossenheim

Auslandsaufenthalte:

7/09 - 01/10	Austauschschülerin an der Kamo High School in Whangarei, Neuseeland
--------------	---

31.01 - 9.02.07	Schüleraustausch mit dem Collège Le Likes Quimper, Frankreich
-----------------	---

Praktika:

10.2016	Famulatur im Bereich Allgemeinmedizin
07/08. 2016	Famulatur in der Notaufnahme, Mercy Hospital, Cork, Irland
03/04.2016	Famulatur im Bereich Kinderheilkunde
08/09.2015	Famulatur im Bereich Dermatologie, Universitätsklinikum, Mannheim
02/03.2015	Famulatur im Bereich Innere Medizin, Krankenhaus Salem, Heidelberg (HD)
07/08.2013	Pflegepraktikum am Universitätsklinikum im Zentrum für Kinder- und Jungenmedizin HD
08/09.2012	Pflegepraktikum im Krankenhaus Salem, HD
07/08.2012	Pflegepraktikum in der ATOS-Klinik, HD
11/2008	Schülerpraktikum; Neuropsychologische Abteilung der Rehaklinik Deggendorf

Fremdsprachen:

Englisch:	fließend in Wort und Schrift
Französisch	Grundkenntnisse (4 Jahre)

Soziales Engagement:

2008 – 2009	Klassensprecherin
2005 – 2009	ehrenamtliche Mitarbeit im Schulcafé Berta
2006 – 2008	Johanniter Schulsanitätsdienst

Sonstiges:

2011	Preisträgerin des TheoPrax-Preis, verliehen vom Fraunhofer Institut
------	---

11. Danksagung

Mein Dank gilt zahlreichen Personen, die am guten Gelingen der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Zunächst möchte ich meinen besonderen Dank an meinen Doktorvater, Professor Jochen Utikal, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation unter seiner Leitung zu schreiben, aussprechen. Während der gesamten Betreuungsphase unterstützte er meine Arbeit in vielfältiger Hinsicht. Ohne seine konstruktive Unterstützung und sein professionelles Lektorat hätte diese Dissertation nicht ihren erfolgreichen Abschluss gefunden.

Auch möchte ich mich bei der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universitätsklinik Mannheim unter der Leitung von Professor Sergij Gördt für die Bereitstellung der guten Rahmenbedingungen und Unterstützung für diese Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei Sayran Arif-Said für die hervorragende technische Assistenz.

Darüber hinaus gilt mein Dank dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, und dem nationalen Centrum für Tumorerkrankungen (NCT), Heidelberg, für die technische Unterstützung beim Anfertigen der TMAs und Einscannen der Färbungen.

Der Abteilung für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung unter der Leitung von Professorin Christel Weiß sowie der hilfsbereiten Mitarbeiterin Sylvia Büttner danke ich für die statistische Beratung.

Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus meinen Eltern, die nicht müde wurden, mich zu ermutigen und in jeglicher Hinsicht zu unterstützen. Ohne ihre große Diskussions- und Hilfsbereitschaft hätte der Abschluss der Arbeit nicht in solch erfolgreichem Ausmaß stattfinden können.